

**Aus der Medizinischen  
Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz  
in Zusammenarbeit mit der Universitäts-Hautklinik Tübingen  
Abteilung Dermatologie (Allgemeine Dermatologie mit Poliklinik)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken**

**Hochregulierung des Aktivierungsmarkers  
E-NPP3 (CD203c) auf der Oberfläche basophiler  
Granulozyten nach In-vitro-Stimulation mit definierten  
Bienen- und Wespengiftallergenen bei  
Insektengiftallergikern**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Marc Martin Binder  
aus  
Stuttgart-Bad Cannstatt**

**2005**



|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| Dekan:               | Professor Dr. C. D. Claussen |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. G. Fierlbeck   |
| 2. Berichterstatter: | Privatdozentin Dr. I. Kötter |



Für meine Eltern



# Inhalt

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | 01 |
| 1.1      | Die Insektengiftallergie   | 01 |
| 1.1.1    | Epidemiologische Daten zur Hymenopteringiftallergie                                    | 01 |
| 1.1.2    | Pathogenese und klinische Erscheinungsbilder der Bienen- und Wespengiftallergie        | 02 |
| 1.2      | Diagnostik der Insektengiftallergie  | 04 |
| 1.3      | Zusammensetzung des Bienen- und Wespengiftes   | 06 |
| 1.3.1    | Pharmakologisch-toxische Wirkungen der Giftbestandteile                                | 07 |
| 1.3.2    | Allergene des Bienen- und Wespengiftes   | 08 |
| 1.4      | Zielsetzungen der Studie   | 09 |
| <br>     |  |    |
| <b>2</b> | <b>Patienten, Material und Methoden</b>  | 11 |
| 2.1      | Studienaufbau, Patienten und Kontrollpersonen  | 11 |
| 2.2      | Standardverfahren der Allergiediagnostik   | 12 |
| 2.2.1    | Beurteilung der Schwere der geschilderten klinischen Symptome nach einem Insektenstich | 12 |
| 2.2.2    | Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper gegen die Insektengifte im Serum            | 13 |
| 2.2.3    | Hauttests  | 14 |
| 2.3      | In-vitro-Untersuchungen zur CD203c-Expression der basophilen Granulozyten              | 15 |
| 2.3.1    | Antikörper, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien   | 15 |
| 2.3.2    | Puffer und Lösungen  | 16 |
| 2.3.3    | Allergene  | 16 |
| 2.3.4    | Geräte und Laborausstattung  | 16 |
| 2.3.5    | In-vitro-Stimulation der Basophilen  | 17 |
| 2.3.6    | Durchflusszytometrische Untersuchungen   | 17 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.3.7    | Kultivierung der Nonresponder-Basophilen<br>in IL-3-haltigem Medium  | 22        |
| 2.4      | Statistische Methoden  | 23        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>25</b> |
| 3.1      | Ergebnisse der Standarddiagnostik  | 25        |
| 3.1.1    | Schweregrad der allergischen Reaktionen innerhalb<br>der einzelnen Allergikergruppen                                       | 27        |
| 3.1.2    | Insektengiftspezifische IgE-Antikörper im Patientenserum   | 28        |
| 3.1.3    | Ergebnisse der Hauttests   | 30        |
| 3.2      | Durchflusszytometrische Untersuchung der CD203c-Expression<br>der Basophilen   | 31        |
| 3.2.1    | CD203c-Expression der basophilen Granulozyten vor<br>Allergenstimulation   | 31        |
| 3.2.2    | Allergeninduzierte Hochregulation von CD203c   | 32        |
| 3.2.3    | Allergeninduzierte Hochregulation von CD203c nach<br>vorhergehender Kultivierung der Basophilen in<br>IL-3-haltigem Medium | 53        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>61</b> |
| 4.1      | Diagnostische Möglichkeiten bei Insektengiftallergien  | 61        |
| 4.1.1    | Standarddiagnostik   | 61        |
| 4.1.2    | Effektorzell-basierte In-vitro-Diagnostik  | 62        |
| 4.1.3    | Einsatz rekombinanter oder gereinigter<br>Insektengiftkomponenten  | 63        |
| 4.1.4    | Kultivierung von Nonresponder-Basophilen in<br>IL-3-haltigem Medium  | 65        |
| 4.2      | Diskussion der Ergebnisse der Studie   | 67        |
| 4.2.1    | CD203c-Expression der basophilen Granulozyten vor<br>Allergenstimulation   | 67        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2    | CD203c-Expression der basophilen Granulozyten nach Allergenstimulation   | 67        |
| 4.2.3    | Allergeninduzierte Hochregulation von CD203c nach vorhergehender Kultivierung der Basophilen in IL-3-haltigem Medium | 70        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>75</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang</b>  | <b>77</b> |
| 6.1      | Verzeichnis verwendeter Abkürzungen  | 77        |
| <b>7</b> | <b>Literatur</b>   | <b>79</b> |



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Insektengiftallergie

### 1.1.1 Epidemiologische Daten zur Hymenopterenengiftallergie

Insektenstiche durch Bienen oder Wespen verursachen gewöhnlich vorübergehende, umschriebene Hautreaktionen in Form von Schwellung, Rötung und Schmerzhaftigkeit des Stiches. Dagegen kann es bei sensibilisierten Personen zu schweren, sogar lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen kommen [92]. Gesteigerte örtliche Reaktionen auf Hymenopterenstiche werden von 2-19%, systemische Allergiereaktionen von 0,8-5% der Bevölkerung berichtet [1, 13, 38, 45, 96, 121, 122]. Eine Studie, welche die Verbreitung der Insektengiftallergie (Biene, Wespe, Hornisse) in Deutschland an knapp 10.000 Personen über 14 Jahren mit Hilfe von Fragebögen untersuchte, erbrachte eine Prävalenz von 1,2 bis 4,5% [29]. In Deutschland werden jährlich etwa 10 Todesfälle als Folge einer Insektengiftallergie verzeichnet. Zusätzlich muss vermutet werden, dass ein Teil plötzlicher, ungeklärter Todesfälle durch anaphylaktische Reaktionen auf Insektengift verursacht wird [119].

Für allergische Allgemeinreaktionen nach Insektenstichen sind in Europa überwiegend Hymenopteren der Familien Apidae und Vespidae verantwortlich. Insbesondere die Honigbiene (*Apis mellifera*), im folgenden als Biene bezeichnet, und die (Kurzkopf-)Wespen (*Vespula vulgaris* und *germanica*), im folgenden vereinfachend Wespe genannt, spielen eine herausragende Rolle. Andere Vespidae wie Hornissen (*Vespa*), Papierwespen (*Polistes*) und Langkopfwespen (*Dolichovespulae*) sind selten Auslöser allergischer Reaktionen und haben allenfalls lokale Bedeutung. Ähnliches gilt für die Hummel (*Bombus*). Ameisen (*Formicidae*, *Myrmicidae*, *Poneridae*) spielen als Verursacher allergischer Insektenstichreaktionen in Europa im Gegensatz zu Amerika und Australien keine Rolle [110].

### **1.1.2 Pathogenese und klinische Erscheinungen der Bienen- und Wespengiftallergie**

Bei allergischen Allgemeinreaktionen auf einen Bienen- oder Wespenstich handelt es sich in der Regel um eine Allergie vom Soforttyp. Diese wurde von Coombs und Gell bei der Einteilung allergischer Reaktionen auch als Typ-I-Reaktion klassifiziert [14, 15, 33]. Allergische Sofortreaktionen werden durch Antikörper der Klasse IgE vermittelt. Im Falle der Insektengiftallergie bildet das betroffene Individuum nach einem Stichereignis spezifische IgE-Antikörper gegen bestimmte, allergene Bestandteile des Hymenopterengiftes (vgl. Kap. 1.3.2). Diese IgE-Antikörper zirkulieren im Körper. Sie binden über den Fc-Teil ihrer konstanten Region vor allem an Zellen, die auf der Oberfläche hochaffine Fc $\epsilon$ -Rezeptoren aufweisen. Dies sind einerseits Mastzellen, andererseits basophile Granulozyten. Beide Zellpopulationen sind als Effektorzellen der allergischen Sofortreaktion anzusehen. Während basophile Granulozyten im Blut vorkommen, sind Mastzellen gewebsständig und lassen sich vor allem in der Haut und den Schleimhäuten der Lunge und des Gastrointestinaltraktes nachweisen. IgE-Antikörper können zellgebunden mehrere Wochen lang erhalten bleiben.

Nach dieser Phase der Sensibilisierung kann der nächste Kontakt mit dem Allergen, also ein erneuter Insektenstich, zur eigentlichen allergischen Reaktion führen. Dabei binden die Allergene an zellfixierte, allergenspezifische IgE-Antikörper. Die Kreuzvernetzung benachbarter Antikörper durch die polyvalenten Allergenmoleküle löst Membranveränderungen an den Mastzellen und Basophilen aus. Dies stellt den Beginn einer ins Zellinnere vermittelten Signalkaskade dar. Die Aktivierung der Effektorzellen endet mit der Verschmelzung ihrer zytosolischen, basophilen Granula mit der Zellmembran und der Freisetzung gespeicherter, präformierter Mediatorsubstanzen. Gleichwohl kommt es zur De-novo-Synthese von Arachidonsäuremetaboliten. Die wichtigsten Mediatoren sind Histamin, verschiedene Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) und Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>) sowie diverse Zytokine. Diese Stoffe bewirken eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie Kapillardilatation und führen zu Kontraktionen der glatten Muskulatur, vor allem an den Bronchien und im Gastrointestinaltrakt. An den Atemwegen kann eine Steigerung der Sekretion beobachtet werden.

Die beschriebenen pharmakologischen Effekte der Mediatoren bedingen die verschiedenen klinischen Symptome, welche bei einer allergischen Allgemeinreaktion auftreten. Es sind überwiegend Organe betroffen, die reich an Effektorzellen sind, d.h. die Haut, der Gastrointestinaltrakt, der Respirationstrakt und das Herz-/ Kreislaufsystem. Klinisch zeichnen sich die Sofortreaktionen durch eine kurze Latenz zwischen der Allergenexposition (Stichereignis) und dem Auftreten körperlicher Beschwerden nach wenigen Minuten bis einer Stunde, selten länger, aus [55].

Die am häufigsten beobachtete Hautmanifestation einer Insektengiftallergie ist die Urtikaria. Die auftretenden Quaddeln können einzeln stehen oder konfluieren und betreffen meist den gesamten Körper. Die Urtikaria ist gewöhnlich von starkem Juckreiz begleitet. Das morphologische Substrat der urtikariellen Quaddel ist ein intrakutanes Ödem. Häufig mit der Urtikaria vergesellschaftet ist das Angioödem (Quincke-Ödem). Es handelt sich um eine subkutane, meist periorbitale und periorale Schwellung, die mitunter monströse, entstellende Ausmaße annehmen kann.

Gastrointestinale Symptome reichen von bloßer Übelkeit bis hin zu Erbrechen, Abdominalkrämpfen und Durchfällen. Sie dürften einer Typ-I-Reaktion der Darmwand mit Schleimhautödem und Spasmen der glatten Muskulatur entsprechen. Die Stuhlinkontinenz im Rahmen eines anaphylaktischen Schocks mit Bewusstlosigkeit ist dagegen eher die Folge einer Hypoxie im Bereich zentralnervöser vegetativer Zentren.

Atemnot als Kardinalzeichen einer respiratorischen Beteiligung kann durch Affektion der oberen (Laryngxödem) wie der unteren Atemwege (Bronchialobstruktion) bedingt sein. Veränderungen im Bereich der Atemwege sind vermutlich die häufigste Ursache für Todesfälle nach Hymenopterenstichen [4].

Kardiovaskuläre Symptome reichen von einer milden Hypotonie mit Schwindel oder Herzklopfen bis zur Maximalvariante der allergischen Reaktion, dem anaphylaktischen Schock. Dieser ist meist von den anderen beschriebenen Symptomen begleitet und als pathogenetischer Endzustand der allergischen Reaktion anzusehen. Flüssigkeitsverschiebungen in die Haut und Flüssigkeitsverluste

über den Magen-/ Darmtrakt (Erbrechen, Durchfall) vermindern das zirkulierende Blutvolumen und provozieren eine Hypotonie. Der Bronchospasmus und die erhöhte bronchiale Sekretion führen zur Bronchialobstruktion und begünstigen eine Hypoxie und Azidose. Dies vermindert die kardiale Leistungsfähigkeit. Hinzu kommt eine direkte Kardiotoxizität einiger Mediatorsubstanzen. Haben Hypovolämie, abgefallene Herzleistung und verminderter peripherer Widerstand ein kritisches Maß überschritten, tritt der Schockzustand ein.

Nach der Bedrohlichkeit der Symptome für das betroffene Individuum findet eine Einteilung der allergischen Reaktion in klinische Schweregrade statt (Kapitel 2.2.1, Tab. 2). Dies stellt einen der ersten Schritte in der Diagnostik von Insektengiftallergien dar.

## **1.2 Diagnostik der Insektengiftallergie**

Die Erhebung der Stichanamnese mit Beurteilung der geschilderten körperlichen Beschwerden, Hauttests und die Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper gegen die Insektengifte im Patientenserum gelten als Standardmaßnahmen zur Sicherung einer Insektengiftallergie [94, 110].

Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren verschiedene In-vitro-Allergietests entwickelt, die eine vorhandene Sensibilisierung auf Effektorzellniveau nachweisen. Diese Verfahren verfolgen im Wesentlichen 2 Strategien:

- (1) Messung von Mediatoren, die während einer allergischen Reaktion aus basophilen Granulozyten oder Mastzellen freigesetzt werden.
- (2) Quantifizierung von Markern, die nach allergeninduzierter Aktivierung der Basophilen auf deren Zelloberfläche verstärkt exprimiert werden. Die Quantifizierung der Oberflächenmarker erfolgt mit Hilfe der Durchflusszytometrie [18].

Ein Oberflächenmolekül, das sich als Aktivierungsmarker basophiler Granulozyten eignet, ist die Ecto-Nucleotidpyrophosphatase/ Phosphodiesterase3 (ENPP3), auch CD203c genannt. CD203c wird unter den Zellen des peripheren Blutes ausschließlich auf basophilen Granulozyten exprimiert und spezifisch

vom monoklonalen Antikörper 97A6 erkannt [11, 12, 35]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte für 22 Insektengiftallergiker gezeigt werden, dass die In-vitro-Stimulation der Basophilen mit Wespen- oder Bienengiftextrakten zu einer signifikanten und spezifischen Zunahme der CD203c-Expression führt [109].

Der Nachteil der bisherigen In-vitro-Allergietests liegt darin, dass ihr Einsatz auf Responder beschränkt ist. Nonresponder sind Individuen, deren basophile Granulozyten einen Defekt in der intrazellulären Signalkaskade aufweisen, die dem hochaffinen IgE-Rezeptor nachgeschaltet ist. Als Folge davon sind die Nonresponder-Basophilen nicht in der Lage, Histamin freizusetzen oder granulaassoziierte Moleküle wie CD63 und CD203c auf der Oberfläche hochzuregulieren. Der Anteil der Nonresponder an der Allgemeinbevölkerung liegt im Bereich von 8 bis 20% [76, 57, 101]. Dies bedeutet eine limitierte Einsetzbarkeit der In-vitro-Tests und ist wahrscheinlich der Hauptgrund dafür, dass sich diese Methoden in der Routinediagnostik bislang noch nicht etablieren konnten.

In den letzten Jahren gelang es vermehrt, die molekulare Struktur von Pflanzen- und Insektenallergenen zu klären [74, 120, 125, 134]. Durch Auftrennung von Allergengemischen oder Einsatz gentechnischer Methoden ist es heute möglich, definierte, gereinigte oder rekombinante Einzelallergene herzustellen [10]. Sie finden ihre Anwendung in der Erforschung immunologischer Grundlagen, werden jedoch in letzter Zeit auch verstärkt für die klinische Diagnostik von Typ-I-Allergien benutzt [16, 44, 77, 117, 132]. Im Gegensatz zu Allergengemischen ist es mit Hilfe einer Serie von Einzelallergenen möglich, das exakte Sensibilisierungsmuster eines Individuums festzulegen und eine auf den Patienten zugeschnittene Hyposensibilisierungstherapie anzuschließen.

Die Klärung einer Sensibilisierung auf molekularer Ebene findet auch in der Diagnostik der Insektengiftallergien zunehmend Verbreitung. Grundvoraussetzung dafür ist eine Weiterentwicklung der eingesetzten Allergenzubereitungen: Giftsackextrakte, die ehemals die Ganzkörperpräparate ablösten [118], werden gegenwärtig durch singuläre Insektengiftallergene ersetzt. Aus diesem Grund kamen auch in dieser Studie neben den herkömmlichen Insektengiftextrakten

definierte, gereinigte oder rekombinante Bienen- und Wespengiftallergene zum Einsatz. Deshalb soll im Folgenden näher auf die Zusammensetzung des Bienen- und Wespengiftes und auf die pharmakologische und allergologische Bedeutung der verschiedenen Giftkomponenten eingegangen werden.

### **1.3 Zusammensetzung des Bienen- und Wespengiftes**

Die Gifte der Biene und der Wespe sind Gemische aus einer Vielzahl verschiedener Einzelkomponenten. Diese lassen sich anhand ihres Molekulargewichtes in drei größere Untergruppen gliedern. Moleküle mit einem Gewicht von bis zu 1 kDa. Sie umfassen im Wesentlichen biogene Amine. Basische Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 1 und 5 kDa und als dritte Gruppe Proteine mit Molekülmassen zwischen 10 und 50 kDa. Die basischen Peptide nehmen mit 50-60% des Trockengewichtes den größten Masseanteil des Insektengiftes ein, gefolgt von den beiden anderen Stoffgruppen mit jeweils ca. 20-30% des Trockengewichtes [24, 54, 56, 58] (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Überblick über die Inhaltsstoffe des Giftes der Honigbiene (*Apis mellifera*) und der Wespe (*Vespula vulgaris*). <sup>+</sup> = Nebenallergen. <sup>++</sup>, <sup>+++</sup> = Hauptallergen.**

| Stoffgruppe                             | Wichtigste Vertreter im Bienen-gift   | Wichtigste Vertreter im Wes-pengift   |
|---|---|---|
| Niedermolekulare Substanzen (MG: <1kDa) | Histamin<br>Dopamin<br>Noradrenalin<br>Aminosäuren<br>Oligopeptide<br>Phospholipide<br>Kohlenhydrate                                      | Histamin<br>Serotonin<br>Acetylcholin<br>Aminosäuren<br>Polyamine<br>Kohlenhydrate                      |
| Peptide (MG: 1-5 kDa)                   | Melittin <sup>+</sup><br>Apamin<br>MCD-Peptid   | Mastoparan<br>Hämolyisin <sup>+</sup><br>Kinine<br>Chemotaktisches Peptid                               |
| Proteine (MG: >10 kDa)                  | Phospholipase A <sub>2</sub> <sup>+++</sup><br>Hyaluronidase <sup>+++</sup><br>Saure Phosphatase <sup>++</sup><br>Allergen C <sup>+</sup> | Phospholipase A <sub>1</sub> <sup>+++</sup><br>Hyaluronidase <sup>+++</sup><br>Antigen 5 <sup>+++</sup> |

Die Einzelkomponenten der beiden Insektengifte lassen sich unter pharmakologisch-toxikologischen wie unter allergologischen Gesichtspunkten betrachten. Toxische Wirkungen der Insektengiftbestandteile sind unabhängig von einem etwaigen allergischen Status und treten bei jedem gestochenen Individuum auf. Dagegen machen sich allergisch-anaphylaktische Reaktionen nur bei Personen mit Insektengiftallergie bemerkbar (Kapitel 1.1.2).

### 1.3.1 Pharmakologisch-toxische Wirkungen der Giftbestandteile

Im Bienen- wie im Wespengift spielt Histamin die größte Rolle unter den ange-troffenen biogenen Aminen. Es macht 1% des Gesamtgewichtes des Bienengif-tes und 3-6% des Wespengiftes aus [61]. Histamin wirkt vasodilatorisch, stei-gert die Gefäßpermeabilität und sensibilisiert Nozizeptoren. Dadurch kommt es zu lokalen Reaktionen an der Stichstelle in Form von Schmerz, Rötung und Schwellung. Des Weiteren unterstützt es die Ausbreitung des Giftes im Gewe-be.

Die Peptidtoxine des Bienengiftes (Melittin [40], Apamin [42], MCD-Peptid [39]) und des Wespengiftes (Mastoparan [48], Hämolyisin [25]) sind Moleküle mit stark basischen Eigenschaften. Sie sind in der Lage mit Zellmembranen zu interagieren und besitzen dadurch Zytotoxizität. Dies führt im Falle eines einzelnen Stiches zur lokalen Gewebsschädigung. Bei multiplen Stichen können Hämolyse und Organschädigungen mit Todesfolge auftreten [30, 91]. Wespengift enthält des weiteren Kinine, die ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie die biogenen Amine aufweisen.

Bei den Proteinen des Bienen- und Wespengiftes handelt es sich überwiegend um Enzyme. Phospholipasen wandeln Serumphospholipide in reaktive Lyso-phospholipide um und wirken über diese indirekt zytotoxisch. Sie machen den Hauptanteil der in beiden Giften enthaltenen Proteinen aus. Hyaluronidasen spalten Mukopolysaccharide des Hautbindegewebes und führen zur Ausbreitung des Insektengiftes im Gewebe. Daneben wurden etliche weitere Proteine in beiden Giften nachgewiesen, deren biologische Funktion häufig noch ungeklärt ist. Von ihnen ist Antigen 5 für das Wespengift von großer Bedeutung. Es macht mit 5-10% einen beträchtlichen Anteil der Gesamtmasse des Wespengiftes aus und besitzt allergene Potenz. Für das Bienengift sei wegen der allergologischen Bedeutung die saure Phosphatase erwähnt.

### **1.3.2 Allergene des Bienen- und Wespengiftes**

Allergene bedürfen einer gewissen Größe, um als solche wirksam zu sein. Deshalb handelt es sich bei den Insektengiftallergenen im Wesentlichen um die großmolekularen, enzymatisch aktiven Proteine. Eine Ausnahme stellt das Bienengiftallergen Melittin dar, das nur 26 Aminosäurereste und ein Molekulargewicht von 2,8 kDa besitzt. Seine allergene Potenz ist jedoch gering [73].

Bienengift besitzt drei Hauptallergene – Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1) [73, 79, 124], Hyaluronidase (Api m2) [53, 63] und saure Phosphatase (Api m3) [125]. Als Nebenallergene gilt Melittin (Api m4). Ein hochmolekulares Protein namens Allergen C scheint ebenfalls geringe allergene Potenz zu besitzen [62]. Kürzlich gelang es, ein weiteres Allergen des Bienengiftes (Api m6) zu identifizieren [67].

Wespengift enthält die Hauptallergene Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1), Hyaluronidase (Ves v2) und Antigen 5 (Ves v5) [25, 49, 51, 72, 74]. Sie kommen im Gift aller bisher untersuchten *Vespula*-, *Vespa*-, *Dolichovespula*- und *Polistes*-Arten vor. Nur bei einigen Wespenarten konnten im Gift verschiedene Phosphatasen und Proteasen als Allergene identifiziert werden [25,84]. Ebenso wie das niedermolekulare Hämolyisin [25] und die hochmolekularen Antigene V-mac 1 und V-mac 3 [49] scheinen sie aber nur eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der Induktion von Allergien zu spielen.

Insektengifte enthalten artspezifische wie auch gemeinsame, artübergreifende Allergene. Letztere besitzen eine mehr oder weniger große Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Diese ist umso größer, je näher die beiden verglichenen Arten miteinander verwandt sind. Für das Bienen- und das Wespengift ist die Hyaluronidase das einzige gemeinsame Allergen. Die beiden Hyaluronidasen weisen eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von etwa 55% und dieselbe enzymatische Spezifität auf [74]. Dagegen sind die Phospholipasen – Phospholipase A<sub>2</sub> der Biene und Phospholipase A<sub>1</sub> der Wespe – unterschiedliche Moleküle mit verschiedenen enzymatischen Spezifitäten. Sie zeigen keine Homologie in der Aminosäuresequenz. Wie oben beschrieben kommen Phospholipase A<sub>1</sub>, Hyaluronidase und Antigen 5 als Hauptallergene in allen Vespidae-Giften vor. Für die in dieser Arbeit mituntersuchten Allergene der Papierwespe Phospholipase A<sub>1</sub> (Pol a1) und Hyaluronidase (Pol a2) besteht eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zu den homologen Proteinen der Wespe (*Vespula vulgaris*) von etwa 55 bzw. 70% [50, 74].

## 1.4 Zielsetzungen der Studie

Die hier durchgeführte Studie dient der Weiterentwicklung eines kürzlich beschriebenen In-vitro-Allergietests [109]. Dieser nutzt die Hochregulierung des Aktivierungsmarkers CD203c auf allergenstimulierten Basophilen zum Nachweis einer bestehenden Sensibilisierung. In dieser Arbeit wurde der Stimulationsassay von ursprünglich 70 auf 45 Minuten verkürzt, um die Einsatzfähigkeit

des Tests in der klinischen Routine zu verbessern. Es sollte nachgewiesen werden, dass auch diese zeitsparende Variante des In-vitro-Allergietests zur sensitiven und spezifischen Erkennung von bienen- und/ oder wespengiftallergischen Patienten geeignet ist.

Neben den Bienen- und Wespengiftextrakten wurden zusätzlich definierte, gereinigte oder rekombinante Insektengiftallergene zur In-vitro-Stimulation eingesetzt. Ziel war es, für jeden untersuchten Patienten das individuelle Muster der Sensibilisierung gegen die verwendeten Insektengiftkomponenten zu analysieren.

Da insektengiftallergische Nonresponder eine wesentliche Limitierung des hier eingesetzten Tests darstellen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese Patienten der In-vitro-Diagnostik zugänglich zu machen. Dafür wurden die basophilen Granulozyten der im Patientenkollektiv gefundenen Nonresponder mit Interleukin-3 vorbehandelt. Anschließend wurde untersucht, ob sich durch dieses Verfahren die Fähigkeit der Basophilen zur allergen-spezifischen Hochregulation von CD203c wiederhergestellt lässt.

## **2 Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Studienaufbau, Patienten und Kontrollpersonen**

42 Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen (19 Frauen und 23 Männer im Alter von 7 bis 67 Jahren) mit Verdacht auf eine Insektengiftallergie wurden untersucht. Die Diagnostik umfasste die zum Nachweis einer Hymenopteren-giftallergie in der Universitäts-Hautklinik Tübingen routinemäßig durchgeführten Untersuchungen: Erhebung der Stichanamnese und Beurteilung der geschilder-ten Symptome nach einem Insektenstich, intrakutane Hauttests und die Be-stimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen die Insektengifte im Patientense-rum.

Zusätzlich wurde für jeden Patienten in vitro die CD203c-Expression der ba-sophilen Granulozyten vor und nach Stimulation mit Insektengiftallergenen un-tersucht. Für diese Versuche wurden jedem Probanden 5 ml peripheres, venö-ses Blut in Lithium/ Heparin-Monovetten entnommen. Keiner der Probanden hatte innerhalb der letzten 4 Wochen vor Blutentnahme Antihistaminika oder Glukokortikoide eingenommen. Die Blutentnahme erfolgte nach den Richtlinien der lokalen Ethikkommission der Universität Tübingen mit dem Einverständnis der Patienten.

Die Ergebnisse der Standarddiagnostik wurden benutzt, um die untersuchten Personen in Allergikergruppen einzuteilen: Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift, Patienten mit Sensibilisierung gegen Wespengift, Patienten mit Sen-sibilisierung gegen Bienen- und Wespengift sowie Patienten ohne Nachweis einer Sensibilisierung auf die genannten Insektengifte.

Den Befunden der Routinediagnostik wurden jene der In-vitro-Untersuchungen gegenübergestellt.

Die Kontrollgruppe bestand aus 9 gesunden Personen ohne bekannte Allergie ( 5 Frauen und 4 Männer im Alter von 24 bis 55 Jahren).

## 2.2 Standardverfahren der Allergiediagnostik

### 2.2.1 Beurteilung der Schwere der geschilderten klinischen Symptome nach einem Insektenstich

Für die 42 Patienten wurden die körperlichen Beschwerden, welche sich nach einem Stichereignis einstellten, anamnestisch erhoben. Anhand der geschilderten Symptome wurde der Schweregrad der allergischen Reaktion festgelegt, wobei die von Mueller vorgeschlagene Klassifikation Verwendung fand [93]. In Tabelle 2 sind die Einteilungskriterien wiedergegeben.

**Tabelle 2: Schweregrade allergischer Reaktionen nach einem Insektenstich (nach H.L. Mueller) .**

| Mueller-Grad | Körperliche Symptome  |
|--------------|---|
| Grad I       | <u>Leichte Allgemeinreaktion</u><br>Symptome: generalisierte Urtikaria, Juckreiz, Unruhe, Unwohlsein  |
| Grad II      | <u>Mäßige Allgemeinreaktion</u><br>beliebige Symptome des Grades I plus:<br>Quincke-Ödem, erschwerte Atmung, Giemen, Abdominalkrämpfe, Übelkeit/ Erbrechen, Schwindelgefühl |
| Grad III     | <u>Schwere Allgemeinreaktion</u><br>Symptome der Grade I und II plus:<br>Dyspnoe, Dysphagie, Heiserkeit, verwaschene Sprache, Verwirrtheit, Todesangst                      |
| Grad IV      | <u>Schockreaktion</u><br>Symptome der Grade I-III plus:<br>Zyanose, Blutdruckabfall, Kollaps, Harn- und Stuhlinkontinenz, Bewusstlosigkeit                                  |

### **2.2.2 Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper gegen die Insektengifte im Serum**

Die Konzentrationen an bienengift- und wespengiftspezifischen IgE-Antikörpern im Serum der Patienten und Kontrollpersonen wurden mit Hilfe des UniCAP<sup>®</sup> Specific IgE Assay im CAP 100 Gerät (beides Pharmacia + Upjohn, Freiburg, Deutschland) ermittelt.

Probengewinnung: Den Patienten und Kontrollpersonen wurden 10 ml peripheres, venöses Blut in Serum-Monovetten entnommen. Das durch Zentrifugation der Blutproben gewonnene Serum wurde am selben Tag analysiert oder bis zur Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Testverfahren: Beim verwendeten Testverfahren handelte es sich um einen Fluoreszenzenzymimmunoassay: Das an ein Trägermaterial (Zellulose-schwamm) adsorbierte Allergen wurde mit Patientenserum inkubiert. Nach Auswaschen ungebundener Antikörper erfolgte die Markierung mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper ( $\beta$ -Galaktosidase-markierter, monoklonaler Maus-anti-humanes-IgE-Antikörper). Die Proben wurden erneut gewaschen und anschließend mit Entwicklerreagenz (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktosid 0,01%) inkubiert. Nach Ablauf der enzymatischen Reaktion wurde die Fluoreszenzintensität der Proben ermittelt und mit parallel gemessenen Kalibratoren (humanes IgE in Puffer) verglichen.

Die Konzentrationen an spezifischen IgE-Antikörpern wurden in kU/l angegeben und in CAP-RAST-Klassen eingeteilt (Klasse 0:  $< 0.35$  kU/l, Klasse 1:  $0.36-0.7$  kU/l, Klasse 2:  $0.71-3.5$  kU/l, Klasse 3:  $3.51-17.5$  kU/l, Klasse 4:  $17.51-50$  kU/l, Klasse 5:  $50.1-100$  kU/l, Klasse 6:  $>100$  kU/l).

Die Interpretation der ermittelten CAP-RAST-Klassen ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

**Tabelle 3: Interpretation der CAP-RAST-Klassen [59, 106]**

| CAP-RAST-Klasse | Menge der allergenspezifischen IgE-Antikörper | Interpretation                 |
|-----------------|---|--------------------------------|
| 0               | keine oder nicht nachweisbar                  | Negativer serologischer Befund |
| 1               | niedrig                                       | Grenzbefund                    |
| 2               | mittel  | Positiver serologischer Befund |
| 3               | hoch  |                                |
| 4               | sehr hoch                                     |                                |
| 5               | sehr hoch                                     |                                |
| 6               | sehr hoch                                     |                                |

### 2.2.3 Hauttests

Die Patienten erhielten mit Hilfe einer Tuberkulinspritze intrakutane Injektionen des in Hauttestverdünnungsreagenz verdünnten Bienen- oder Wespengiftes (Reagenzien: Reless, Scherax, Hamurg, Deutschland). Gespritzt wurde ein Volumen von 0,02 ml. Die Giftkonzentration der ersten Injektion betrug  $10^{-4}$  µg/ml. Sie wurde bei negativem Testergebnis alle 20 Minuten um eine Zehnerpotenz bis zu einer Endkonzentration von  $10^{-1}$  µg/ml gesteigert.

Das Verdünnungsreagenz diente als Negativ-, Histamindihydrochloridlösung (10 mg/ml) als Positivkontrolle. Die Testung wurde an Innenseite der Unterarme durchgeführt.

Die Testergebnisse wurden nach 20 Minuten abgelesen. Beurteilt wurde die Größe des entstandenen Erythems sowie der entstandenen Quaddel. Eine Quaddelbildung von größer 5 mm Durchmesser mit umgebendem Erythem größer 10 mm wurde als positive Reaktion gewertet [140]. Es wurden diejenigen Konzentrationen der Insektengifte angegeben, die gerade noch eine positive Reaktion auszulösen vermochten. Trat bei einer Giftkonzentration von  $10^{-1}$  µg/ml kein positiver Hauttest auf, wurde der Test abgebrochen und als negativ gewertet, da oberhalb dieser Grenzkonzentration mit toxischen, nichtallergi-

schen Reaktionen und somit mit einem hohen Prozentsatz falsch positiver Ergebnisse zu rechnen ist [7, 34, 107].

Bei den Kontrollpersonen erfolgten keine Hauttests.

## 2.3 In-vitro-Untersuchungen zur CD203c-Expression der baso-philten Granulozyten

### 2.3.1 Antikörper, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

|   |  |
|---|--|
| Anti-CD203c-PE (97A6-PE)                | 242 µg/ml, Immunotech, Marseille, Frankreich         |
| Anti-Human-IgE (Dε2)-Ak                 | 200 µg/ml, Immunotech, Marseille, Frankreich         |
| BSA                                     | Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD                |
| EDTA                                    | Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD                |
| Hank's Balanced Salt Solution           | Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD                |
| Interleukin-3                           | Immunotech, Marseille, Frankreich                    |
| IOTest Lyse Reagenz C1                  | Immunotech, Marseille, Frankreich                    |
| PBS Dulbeccos<br>w/o Sodium bicarbonate | Gibco BRL, Life Technologies, Paisley,<br>Schottland |
| PBS Special w/o Calcium                 | Gibco BRL, Life Technologies, Paisley,<br>Schottland |
| Penicillin                              | Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD                |
| Reless <sup>®</sup> -Bienengift         | ALK-Scherax, Hamburg, BRD                            |
| Reless <sup>®</sup> -Wespenengift       | ALK-Scherax, Hamburg, BRD                            |
| RPMI 1640-Medium                        | Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD                |
| Streptomycin                            | Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD                |

### 2.3.2 Puffer und Lösungen

|              |   |
|--------------|---|
| FACS-Puffer: | Hank's Balanced Salt Solution +<br>0.1% NaN <sub>3</sub> + 0.1% BSA |
| Stopplösung: | PBS Special w/o Calcium + 20 mM EDTA                                |

### 2.3.3 Allergene

Zur In-vitro-Stimulation der Basophilen wurde neben den Bienen- und Wespengiftextrakten (Reless, Scherax, Hamburg, Deutschland) einzelne, definierte Proteine des Bienen- und Wespengiftes eingesetzt: Für das Bienengift die allergenen Proteine Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1), Hyaluronidase (Api m2) und Melittin (Api m4); für das Wespengift die Proteine Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1), Hyaluronidase (Ves v2) sowie Antigen 5 (Ves v5). Zusätzlich wurden die Proteine Phospholipase A<sub>1</sub> (Pol a1) und Hyaluronidase (Pol a2) der Papierwespe mituntersucht.

Die Bienengiftproteine Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1) und Hyaluronidase (Api m2), die Wespengiftkomponenten Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1) und Hyaluronidase (Ves v2) sowie die Papierwespenproteine stammten von T.P. King, The Rockefeller University, New York, USA. Sie wurden durch Fraktionierung der entsprechenden Insektengifte gewonnen. Die Isolation und Identifizierung der Einzelkomponenten erfolgte anhand unterschiedlicher chromatographischer und elektrophoretischer Eigenschaften sowie der Analyse der verschiedenen Aminosäurezusammensetzungen und enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Proteine [68, 73]. Melittin (Api m4) wurde von Sigma-Aldrich Chemicals, München, Deutschland bezogen. Rekombinantes Antigen 5 (Ves v5) wurde uns von Alk Abelló, Hørsholm, Dänemark zur Verfügung gestellt und wie kürzlich beschrieben hergestellt [90].

### 2.3.4 Geräte und Laborausstattung

|                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| Cellquest Software | Becton Dickinson, San Jose, CA, USA |
| Computer           | Apple Macintosh                     |
| FACSCalibur        | Becton Dickinson, San Jose, CA, USA |

### **2.3.5 In-vitro-Stimulation der Basophilen**

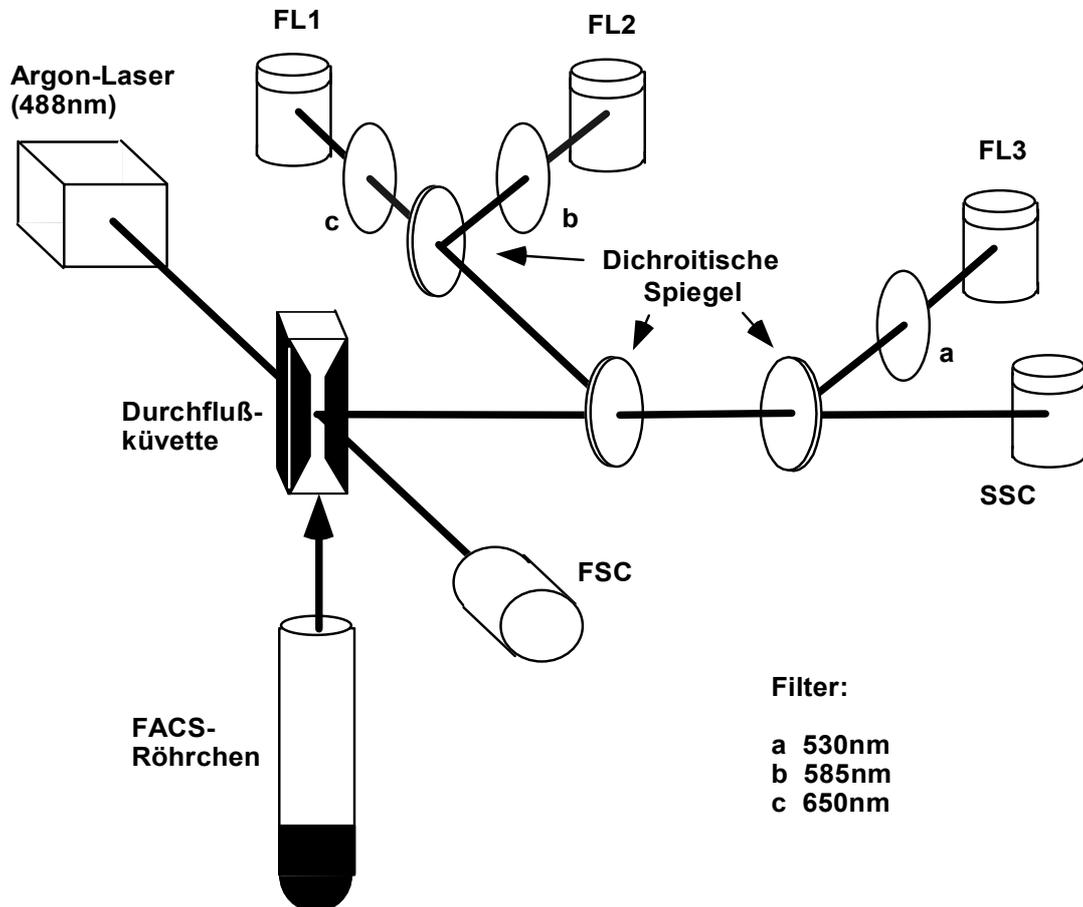
Um die Testdauer zu verkürzen, wurde unser kürzlich entwickelter Stimulationsassay [109] in einigen Parametern modifiziert und wie folgt ausgeführt: Heparinisiertes, peripheres Blut (80µl) wurde mit Bienen- oder Wespengiftextrakt oder den rekombinanten oder gereinigten Giftproteinen (Endkonzentration aller Komponenten 1µg/ml) für 15 Minuten bei 37°C stimuliert. PBS diente als Negativkontrolle, 1µg/ml Anti-IgE-Antikörper als Positivkontrolle. Nach 5 Minuten Stimulation wurden die Ansätze mit 10 µl des CD203c-spezifischen, monoklonalen Antikörper 97A6-PE (1µg/ml Endkonzentration) gefärbt und für die verbleibenden 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl PBS/ 20mM EDTA gestoppt. Im letzten Schritt erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 2ml IOTest Lyse Reagenz C1. Die verbleibenden mononukleären Zellen wurden zweimal gewaschen, in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend auf einem FACSCalibur Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software.

### **2.3.6 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

#### *Methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl an Einzelzellen hinsichtlich unterschiedlicher struktureller Zelleigenschaften zu untersuchen. Die untersuchten Merkmale sind häufig zelluläre Oberflächenmoleküle, ggf. auch zytoplasmatische Strukturen. Es handelt sich bei der Durchflusszytometrie um ein optisches Messsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale der in einem Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen analysiert. Jede untersuchte Zelle wird gesondert auf ihrer Streulicht-/ Fluoreszenzeigenschaften untersucht und die erhobenen Daten an eine nachgeschaltete Datenverarbeitungseinheit übermittelt. Die Messwerte aller untersuchten Zellen lassen sich anschließend statistisch auswerten. Auf diese Weise können nicht nur qualitative Aussagen über zelluläre Parameter gemacht werden, wie dies beispielsweise bei der Fluoreszenzmikroskopie möglich ist, sondern auch quan-

titative. Zellen, die ähnliche Merkmalsausprägungen besitzen und sich darin vom Rest der untersuchten Zellen unterscheiden, lassen sich als eigenständige Population identifizieren.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.** Dargestellt ist der Probenfluss vom FACS-Röhrchen in die Messküvette, wo die Zellen senkrecht vom Laserstrahl getroffen werden. Die erzeugten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden von den Detektionseinheiten gemessen und an die Signalverarbeitung weitergegeben (nicht dargestellt).

Das Durchflusszytometer besteht aus drei funktionellen Grundeinheiten: Dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System sowie der Signalverarbeitung.

Das Flüssigkeitssystem dient dem Transport der zu untersuchenden Zellen vom Probenröhrchen in die Messkammer und zwar so, dass die Zellen den Analysepunkt einzeln passieren. Dies geschieht mit Hilfe eines den Probenstrom umgebenden Hüllstromes, der die Probe in der Messkammer stark beschleunigt und so zu einem dünnen Flüssigkeitsfaden auszieht, in dem die Zellen perl-schnurartig aufgereiht sind (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung).

Das optische System gliedert sich in eine Anregungs- und eine Detektionseinheit. Die Anregung der Zellen erfolgt in der Messküvette mit Hilfe eines Argonlasers (488 nm), der orthogonal zum Probenstrom steht. Die vom Laser getroffenen Zellen streuen das Licht. Dieses Streulicht korreliert mit bestimmten Zellcharakteristika: Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht = Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht = Sideward Scatter, SSC) gibt Auskunft über die interne Struktur der Zelle (Granularität, Membranfaltungen, etc.). Wurden die zu untersuchenden Zellen zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, so absorbiert dieser Farbstoff das auftreffende Laserlicht und emittiert daraufhin Licht einer längeren, charakteristischen Wellenlänge. Die Höhe des Fluoreszenzsignals steht dabei in Zusammenhang mit der Menge des zuvor markierten zellulären Antigens. Werden Fluoreszenzfarbstoffe mit ähnlichen Absorptions-, jedoch unterschiedlichen Emissionsspektren verwendet, lassen sich gleichzeitig mehrere zelluläre Strukturen untersuchen. Streulicht- wie auch Fluoreszenzsignale können über die Detektionseinheit gemessen werden. Diese gliedert sich in zwei Baugruppen: Eine Baugruppe zur Messung des axialen Vorwärtsstreulichtes, und eine zweite, senkrecht dazu angebrachte, zur Bestimmung des Seitwärtsstreulichtes und der Fluoreszenzsignale. Die beiden letztgenannten Signale werden ihrerseits durch Strahlteiler und verschiedene Filter aufgetrennt und sind so einzeln erfassbar.

Die Signalverarbeitung beginnt mit der Umwandlung der Lichtsignale in elektrische Impulse, deren Höhe mit der Höhe der Lichtsignale korreliert. Dies erfolgt mit Hilfe einer Fotodiode im Vorwärtsstrahlengang und verschiedenen Fotoröhren für das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzsignale. Die Signale werden verstärkt und von einem Analog-/ Digitalwandler in Klassenzahlen konvertiert. Diese lassen sich als Rohdaten vom nachgeschalteten Computer speichern und stehen der systematischen Auswertung zur Verfügung.

Die erhobenen Messdaten können auf unterschiedliche Weise dargestellt werden. Die einfachste Art ist das Histogramm. Es handelt sich um eine Einparameterdarstellung, welche die Verteilung eines Merkmales innerhalb der unter-

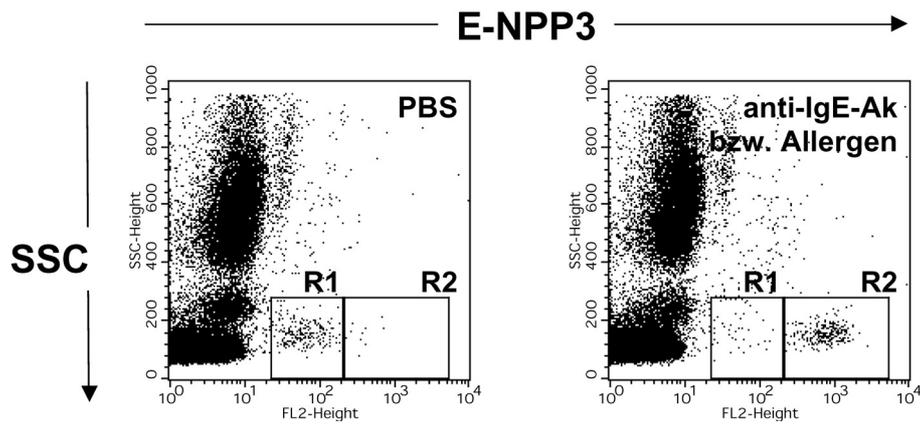
suchten Zellen wiedergibt. Dabei ist die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Streulicht-/ Fluoreszenzintensität (Abszisse) aufgetragen.

Bei der korrelierten Zweiparameterdarstellung sind zwei untersuchte zelluläre Merkmale gegeneinander aufgetragen. Grafisch ergibt sich dadurch ein Punktdiagramm. Jeder Punkt des Diagramms entspricht einer Zelle. Die Lage jedes Punktes ist dabei durch die Höhe der beiden Merkmalsausprägungen der entsprechenden Zelle festgelegt.

#### *Durchflusszytometrische Analyse der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten*

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der verbliebenen mononukleären Zellen des Stimulationsassays handelte es sich um eine Einfarbenfluoreszenzmessung. Für jede untersuchte Zelle wurden die Streulichteigenschaften und die Fluoreszenzintensität nach vorhergehender Markierung mit dem monoklonalen Antikörper Anti-CD203c-PE ermittelt. Letztere diente als Maß für die CD203c-Expression der Zellen. Für jeden Untersuchungsansatz wurden 50.000 Einzelzellen analysiert.

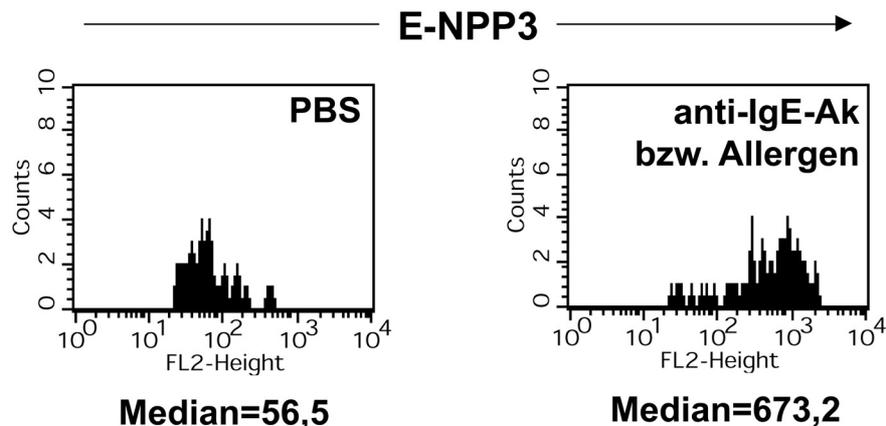
Die Messergebnisse wurden als Punktdiagramm der Parameter Seitwärtsstreulicht SSC (Ordinate) und PE-Fluoreszenzintensität (Abszisse) dargestellt (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Punktdiagramm von 50.000 untersuchten mononukleären Zellen nach Stimulation mit PBS und Anti-IgE-Antikörper/ Insektengiftallergen. Bei den 97A6-positiven Zellen im Gate R1 des linken Punkthistogramms handelt es sich um die basophilen Granulozyten vor allergeninduzierter Zellaktivierung. Nach Stimulation mit Anti-IgE-Ak bzw. Allergen wandern diese Zellen im Punktwolkendiagramm nach rechts, entsprechend einer Zunahme ihrer E-NPP3-Expression (Zellen im Gate R2 des rechten Punktdiagramms).

#### Bestimmung der Medianen Fluoreszenzintensität MFI

Mit Hilfe der Cellquest Software wurde für die 97A6-positiven Zellen die Häufigkeitsverteilung der PE-Fluoreszenz nach Stimulation mit PBS sowie nach Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper bzw. Insektengiftallergenen bestimmt. Die Verteilung wurde als Histogramm dargestellt und der Median der PE-Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Dieser Wert diente als Maß der durchschnittlichen Expression von CD203c auf den untersuchten Basophilen.



**Abbildung 3:** Häufigkeitsverteilung der PE-Fluoreszenz der 97A6-positiven Zellen nach Stimulation mit PBS (links) und Anti-IgE-Antikörper/ Allergen (rechts). Unter den Abbildungen sind die Mediane der Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

### *Berechnung des Stimulationsindex SI*

Die Modulation der E-NPP3-Expression nach Stimulation mit Allergen-/ Anti-IgE-Antikörper wurde durch die Bestimmung des Stimulationsindex (SI) evaluiert, der sich wie folgt berechnet: Verhältnis der medianen Fluoreszenzintensität der Allergen- bzw. Anti-IgE-Antikörper-stimulierten 97A6-positiven Zellen ( $MFI_{stim}$ ) zu der medianen Fluoreszenzintensität der PBS-stimulierten 97A6-positiven Zellen ( $MFI_{PBS}$ ).

$$\text{Stimulationsindex (SI)} = \frac{\text{Median}_{stim}}{\text{Median}_{PBS}} = \frac{673,2}{56,5} = 11,9$$

**Formel 1: Errechnung des Stimulationsindex (SI) mit Rechenbeispiel.**

### **2.3.7 Kultivierung der Nonresponder-Basophilen in IL-3-haltigem Medium**

Bei 4 Patienten mit der Diagnose einer Wespengiftallergie (Nr. 10, 16, 25, 33) war keine Hochregulation von CD203c nach Stimulation mit den rohen Insektengiften, den Insektengiftproteinen oder Anti-IgE-Antikörper nachweisbar. Bei ihnen handelte es sich um Nonresponder. Die Basophilen dieser Individuen sind nach Allergenstimulation nicht in der Lage Histamin freizusetzen oder granulaassoziierte Moleküle wie CD203c und CD63 hochzuregulieren [76, 101, 109]. Es ist bekannt, dass die Behandlung von Nonresponder-Basophilen mit IL-3 ihre Fähigkeit zur Histaminfreisetzung wiederherstellt [66, 139]. Um den Effekt dieser Vorbehandlung auf die Hochregulierbarkeit von CD203c zu überprüfen, wurden 2 der 4 im Patientengut gefundenen Nonresponder (Nr. 16, 33) zu weiteren Tests herangezogen. Als Kontrollindividuen dienten zum einen ein wespengiftallergischer Responder (Nr. 41), zum anderen 2 gesunde Personen ohne bekannte Insektengiftallergie.

Die basophilen Granulozyten der Probanden wurden für verschiedene Zeitintervalle mit 10 ng/ml IL-3 kultiviert. Danach erfolgte die Stimulation mit den Allergenen oder Anti-IgE-Antikörper. Hierzu wurden 3 ml peripheres Blut in 10 ml RPMI 1640 Medium gegeben und zusätzlich 10% FBS,  $2 \times 10^{-5}$  M Penicillin/Streptomycin und 10 ng/ml IL-3 zugesetzt. Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-

Gewebekulturflaschen für 1, 24, 48, 72 und 144 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in PBS gewaschen, anschließend mit Anti-IgE-Antikörper (Positivkontrolle) sowie den rohen Bienen- und Wespengiftextrakten stimuliert (Endkonzentration aller Stimulantien: 1 µg/ml). PBS dient als Negativkontrolle. Auf eine Stimulation mit den einzelnen Insektengiftproteinen wurde verzichtet. Der Stimulationsassay sowie die Analyse der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten wurden durchgeführt wie oben beschrieben.

## 2.4 Statistische Methoden

Durch vorheriges Logarithmieren konnte für die MFI- und die SI-Werte näherungsweise eine Normalverteilung erreicht werden. Deshalb wurden zur statistischen Beurteilung dieser Parameter, Tests durchgeführt, die unabhängige, normalverteilte Stichproben voraussetzen.

Untersucht wurde, ob sich die Basophilen der drei Allergikergruppen und der Kontrollpersonen vor der Stimulation mit spezifischen Allergenen in ihrer CD203c-Expression unterscheiden. Dazu wurden die geometrischen Mittelwerte der  $MFI_{PBS}$  der vier Gruppen mit Hilfe des multiplen Mittelwertvergleichs nach Tukey getestet.

Die Ergebnisse der Stimulationsindices wurden mit dem Dunnett's Test ausgewertet. Für jede Allergikergruppe und die Kontrollgruppe wurde untersucht, ob die Stimulation der basophilen Granulozyten mit rohem Bienengift, Wespengift und Anti-IgE-Antikörper zu einer signifikanten Zunahme des Stimulationsindex gegenüber der Negativkontrolle führt. Es sollte gezeigt werden, dass innerhalb einer Allergikergruppe nur die Stimulation mit dem „adäquaten“ Gift (z.B. Bienengift bei den Bienengiftallergikern) zu einer Erhöhung der CD203c-Expression führt, nicht aber ein „inadäquater“ Stimulus (also z.B. Wespengift bei den Bienengiftallergikern). Hierfür wurden die Mittelwerte der Stimulationsindices für rohes Bienengift, Wespengift und Anti-IgE-Antikörper mit dem Mittelwert der Stimulationsindices für PBS verglichen.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit erster Art wurde generell auf  $p=0,05$  festgelegt, so dass eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p<0,05$  (Signifikanzniveau 5%) als signifikant zu betrachten war. Auf eine weitere Unterteilung in „hochsignifikant“ mit einem Signifikanzniveau von 1% ( $p<0,01$ ) und in „höchstsignifikant“ mit einem Signifikanzniveau von 0,5% ( $p<0,005$ ) wurde wegen der geringen Stichprobenzahl verzichtet.

Für rohes Bienengift und Wespengift wurde aus den gewonnenen Patientendaten der Grenzwert des Stimulationsindex SI errechnet, dessen Überschreitung eine positive Reaktion auf das eingesetzte Stimulans anzeigt. Mit Hilfe der ROC-Kurven ließ sich der Grenzwert des SI für Bienen- wie für Wespengift auf 1,3 festlegen. Auf diese Weise besaß der Test für beide Insektengifte eine maximale Spezifität von 100% (95%-Konfidenzintervall für Bienengift: 90,3 – 100%, für Wespengift 76,8 – 100%). Die zugehörigen Sensitivitäten betrugen für Bienengift 93,0% (95%-Konfidenzintervall: 66,1 - 99,8%), für Wespengift 89,2% (95%-Konfidenzintervall: 74,6 – 97,0%). Der Grenzwert des Stimulationsindex von 1,3 wurde für die Stimulationsversuche mit den definierten, singulären Insektengiftproteinen übernommen. Mit Hilfe des SI-Grenzwertes ließ sich die Anzahl der positiven Reaktionen auf die Insektengiftextrakte und die einzelnen Giftkomponenten ermitteln. Sie wurden als relative Häufigkeiten in % der untersuchten Allergieklienten angegeben.

Um Zusammenhänge zwischen dem Stimulationsindex SI einerseits und den Parametern der Standarddiagnostik (Mueller-Grad, RAST-Klasse, Hauttestergebnisse) andererseits zu ermitteln, wurde für diese Größen der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Jede Allergikergruppe wurde gesondert untersucht. Für die Bienengiftallergiker wurde der Stimulationsindex für rohes Bienengift, für die Wespengiftallergiker jener für rohes Wespengift und für die Bienen- und Wespengiftallergiker die Stimulationsindices für beide Insektengiftextrakte mit den drei genannten Parametern der Standarddiagnostik korreliert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Standarddiagnostik

42 Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen mit der Anamnese einer allergischen Reaktion auf einen Hymenopterenstich sowie 9 Kontrollpersonen ohne Allergieanamnese wurden untersucht. Die Standarddiagnostik umfasste die Erhebung der Stichanamnese mit Beurteilung der geschilderten körperlichen Beschwerden, intrakutane Hauttests und die Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper gegen die Insektengifte im Patientenserum.

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde, wie in Tabelle 4 dargestellt, bei 27 Patienten die Diagnose einer Wespengiftallergie, bei 5 Patienten die Diagnose einer Bienengiftallergie gestellt. Neun Patienten zeigten eine Allergie gegen beide Gifte.

Bei der Patientin Nr. 38 wies nur die Befragung auf eine durch Wespengift ausgelöste allergischen Sofortreaktion hin. Sie litt anamnestisch unter einer schweren allergischen Reaktion (Grad IV nach Mueller) nach vorausgegangenem Wespenstich. Die Hauttests und die Serologie für Bienen- als auch für Wespengift fielen jedoch negativ aus. Die Problematik nicht eindeutiger Ergebnisse der Standarddiagnostik trat bei weiteren Patienten auf (Pat. Nr. 10, 13, 31, 41). Im Zweifel wurde eine Allergie gegen jene/ s Insektengift/ e angenommen, gegen welche/ s nach abgeschlossener Diagnostik eine Hyposensibilisierung eingeleitet wurde.

Patient Nr. 40 zeigte eine für die allergische Sofortreaktion eher atypische Anamnese - zu körperlichen Symptomen kam es erst einen Tag nach dem Stichereignis. Die serologischen Untersuchungen und die Hauttests fielen ebenfalls negativ aus. In diesem Fall wurde keine Insektengiftallergie diagnostiziert.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 4: Ergebnisse der Standarddiagnostik und die daraus abgeleitete Allergiediagnose für die 42 untersuchten Patienten.** Die Allergiediagnose basierte auf der Anamnese (Mueller Grad I-IV), den Hauttests (ausgedrückt als Giftverdünnung in  $10^x \mu\text{g/ml}$  für eine positive Hauttestreaktion) und der Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper (CAP-RAST-Klasse 0-6). - = Negativer Hauttest bei einer Konzentration von  $10^{-1} \mu\text{g/ml}$  des Giftes. B/W = Biene/ Wespe. k.A. = keine Bienen-/ Wespengiftallergie. F = weiblich, M = männlich. n.b. = nicht bestimmt.

| Pat. Nr. | Geschl. | Alter | Schwere der allergischen Reaktion (Mueller-Grad) | Hauttests B/W ( $10^x \mu\text{g/ml}$ ) | Spez. IgE (Cup-Rast-Klasse) B/W | Diagnose |
|----------|---------|-------|--|---|---------------------------------|----------|
| 1        | M       | 67    | II-III   | -/2                                     | 1/2                             | W        |
| 2        | F       | 47    | III  | -/2                                     | 0/4                             | W        |
| 3        | M       | 30    | II   | 3/4                                     | 4/5                             | B+W      |
| 4        | F       | 58    | II   | -/2                                     | 0/2                             | W        |
| 5        | M       | 38    | I-II   | 2/3                                     | 2/2                             | B+W      |
| 6        | F       | 56    | IV   | -/2                                     | 0/2                             | W        |
| 7        | M       | 31    | II   | n.b.                                    | 2/0                             | B+W      |
| 8        | F       | 36    | III-IV   | 2/-                                     | 2/0                             | B        |
| 9        | F       | 52    | III  | -/3                                     | 1/2                             | W        |
| 10       | F       | 29    | III  | -/1                                     | 1/1                             | W        |
| 11       | F       | 35    | III  | -/3                                     | 3/3                             | W        |
| 12       | F       | 39    | IV   | 2/-                                     | 6/2                             | B        |
| 13       | M       | 39    | II   | 1/4                                     | 2/4                             | W        |
| 14       | M       | 52    | III  | -/1                                     | 0/2                             | W        |
| 15       | F       | 54    | II   | -/2                                     | 0/2                             | W        |
| 16       | F       | 39    | II   | -/2                                     | 0/3                             | W        |
| 17       | M       | 60    | IV   | -/3                                     | 1/3                             | W        |
| 18       | F       | 66    | IV   | -/2                                     | 0/2                             | W        |
| 19       | M       | 16    | I  | -/3                                     | 0/3                             | W        |
| 20       | M       | 11    | II   | -/2                                     | 0/5                             | W        |
| 21       | M       | 28    | I  | 1/1                                     | 3/3                             | B+W      |
| 22       | M       | 14    | I  | 2/2                                     | 4/3                             | B+W      |
| 23       | M       | 17    | I  | -/2                                     | 0/0                             | W        |
| 24       | F       | 65    | II   | -/2                                     | 0/3                             | W        |
| 25       | M       | 7     | I  | -/2                                     | 1/4                             | W        |
| 26       | M       | 21    | II   | -/2                                     | 1/2                             | B+W      |
| 27       | F       | 30    | II   | -/1                                     | 0/2                             | W        |
| 28       | F       | 47    | III  | 1/2                                     | 3/2                             | B+W      |

| Pat. Nr. | Geschl. | Alter | Schwere der allergischen Reaktion (Müller-Grad) | Hauttests B/W (10 <sup>x</sup> µg/ml) | Spez. IgE (Cup-Rast-Klasse) B/W | Diagnose |
|----------|---------|-------|---|---------------------------------------|---------------------------------|----------|
| 29       | M       | 64    | II  | -/3                                   | 0/3                             | W        |
| 30       | M       | 60    | II  | -/3                                   | 0/3                             | W        |
| 31       | M       | 27    | II  | 4/1                                   | 3/3                             | B        |
| 32       | M       | 39    | IV  | 2/1                                   | 2/1                             | B+W      |
| 33       | F       | 66    | III   | -/2                                   | 0/2                             | W        |
| 34       | F       | 24    | I   | n.b.                                  | 2/2                             | W        |
| 35       | M       | 23    | III   | -/3                                   | 1/2                             | W        |
| 36       | M       | 53    | IV  | 2/-                                   | 2/0                             | B        |
| 37       | M       | 20    | I   | 2/-                                   | 2/1                             | B        |
| 38       | F       | 52    | IV  | -/-                                   | 0/0                             | W        |
| 39       | F       | 51    | II  | -/1                                   | 2/3                             | W        |
| 40       | M       | 43    | -   | -/-                                   | 0/0                             | k.A.     |
| 41       | M       | 61    | II-III  | 1/2                                   | 2/2                             | W        |
| 42       | F       | 29    | II-III  | 1/2                                   | 2/2                             | B+W      |

### 3.1.1 Schweregrad der allergischen Reaktionen innerhalb der einzelnen Allergikerguppen

Wie in Tabelle 5 gezeigt, umfasste das Patientenkollektiv 18 Personen mit schweren systemischen Reaktionen auf einen Insektenstich (Schweregrad III und IV nach Müller). Davon waren 12 allergisch gegen Wespengift, 3 gegen Bienengift und 3 gegen beide Hymenoptereingifte. Patientin Nr. 38 litt anamnestisch unter den Symptomen einer schweren allergischen Reaktion nach einem Wespenstich, obgleich die angeschlossenen Hauttests und die Serologie für beide Insektengifte negativ ausfielen.

Die restlichen Individuen zeigten leichte bis mittelschwere Allergiereaktionen nach einem Stichereignis (Schweregrad I und II nach Müller).

**Tabelle 5: Schweregrad der allergischen Reaktionen innerhalb der verschiedenen Allergikergruppen.** Zur Festlegung des Schweregrads der allergischen Reaktion wurde die von Mueller vorgeschlagene Klassifikation verwendet. Patienten, deren Schweregrad einen Mittelwert aufwies, wurden dem höheren Allergiegrad zugeordnet. Patient Nr. 40 wurde nicht in die Tabelle aufgenommen.

| Allergie               | Schweregrad der allergischen Reaktion nach Müller |    |     |    | Gesamt |
|------------------------|---|----|-----|----|--------|
|                        | I   | II | III | IV |        |
| Bienengift             | 1   | 1  | -   | 3  | 5      |
| Wespengift             | 4   | 11 | 8   | 4  | 27     |
| Bienen-+<br>Wespengift | 2   | 4  | 2   | 1  | 9      |
| Summe                  | 7   | 15 | 10  | 8  | 41     |

### 3.1.2 Insektengiftspezifische IgE-Antikörper im Patientenserum

Tabelle 6 gibt die serologischen Ergebnisse der untersuchten Patienten wider. Fünfundzwanzig der 27 als Wespengiftallergiker klassifizierten Patienten wiesen spezifische IgE-Antikörper gegen Wespengift im Serum auf. Dabei traten sehr hohe Mengen spezifischer IgE-Antikörper (CAP-RAST-Klasse 4-6) bei 4 der 25 serologisch positiven Patienten, hohe Mengen (CAP-RAST-Klasse 3) bei 8 von 25, mittlere (CAP-RAST-Klasse 2) bei 12 von 25 und niedrige (CAP-RAST-Klasse 1) bei 1 von 25 Patienten auf. Für 2 Patienten (Nr. 23 und 38) ließen sich keine wespengiftspezifischen IgE-Antikörper nachweisen. Die serologische Diagnostik dieser beiden Patienten fiel auch für Bienengift negativ aus. Bei 11 Wespengiftallergikern waren neben spezifischen IgE-Antikörper gegen Wespengift zusätzlich IgE-Antikörper gegen Bienengift nachweisbar. Es waren jedoch überwiegend niedrige (bei 6 der 11 Patienten) oder mittlere Mengen (bei 4 der 11 Patienten) bienengiftspezifischer IgE-Antikörper vorhanden. In einem Fall fand sich ein hoher Wert spezifischer IgE-Antikörper gegen Bienengift.

Bei den Bienengiftallergikern zeigten 5 von 5 Patienten ein positives serologisches Testergebnis für Bienengift; 3 von 5 mit mittleren (CAP-RAST-Klasse 2), einer mit hohen (CAP-RAST-Klasse 3) und einer mit sehr hohen Werten (CAP-RAST-Klasse 4-6) spezifischer IgE-Antikörper gegen Bienengift. Für 3 der 5

bienengiftallergischen Patienten waren auch IgE-Antikörper gegen Wespengift nachweisbar.

Acht von 9 Patienten mit der Diagnose einer Allergie gegen Bienen- und Wespengift besaßen spezifische IgE-Antikörper gegen beide Gifte im Serum. Für den Patienten Nr. 7 ließen sich nur IgE-Antikörper gegen Bienengift nicht aber gegen Wespengift nachweisen. Innerhalb dieses Kollektives fanden sich bei 2 Patienten sehr hohe Mengen spezifischer IgE-Antikörper gegen Bienengift (CAP-RAST-Klasse 4-6), bei 2 Patienten hohe Mengen (CAP-RAST-Klasse 3), bei 4 Allergikern mittlere Mengen (CAP-RAST-Klasse 2) und bei einem der 9 Patienten niedrige Mengen (CAP-RAST-Klasse 1) spezifischer IgE-Antikörper gegen Bienengift. Für Wespengift ließen sich bei diesen Patienten in einem Fall sehr hohe Mengen spezifischer IgE-Antikörper nachweisen. Hohe Antikörpermengen fanden sich 2 Mal, mittlere 4 Mal und niedrige Mengen 1 Mal. Für einen Patienten fanden sich keine spezifischen IgE-Antikörper gegen Wespengift.

**Tabelle 6: Absolute Häufigkeit der CAP-RAST-Klassen für spezifische IgE-Antikörper gegen Bienen- und Wespengift innerhalb der einzelnen Allergikergruppen.**

| Allergie                  | CAP-RAST-Klasse gegen Bienengift / Wespengift |       |         |        |       |       |       |
|---------------------------|---|-------|---------|--------|-------|-------|-------|
|                           | 0   | 1     | 2       | 3      | 4     | 5     | 6     |
| Bienengift (n=5)          | 0 / 2   | 0 / 1 | 3 / 1   | 1 / 1  | 0 / 0 | 0 / 0 | 1 / 0 |
| Wespengift (n=27)         | 16 / 2  | 6 / 1 | 4 / 12  | 1 / 8  | 0 / 3 | 0 / 1 | 0 / 0 |
| Bienen-+ Wespengift (n=9) | 0 / 1   | 1 / 1 | 4 / 4   | 2 / 2  | 2 / 0 | 0 / 1 | 0 / 0 |
| Summe                     | 16 / 5  | 7 / 3 | 11 / 17 | 4 / 11 | 2 / 3 | 0 / 2 | 1 / 0 |

Bei den Kontrollpersonen waren in 8 von 9 Fällen keine spezifischen IgE-Antikörper gegen die Insektengifte nachweisbar. Bei einer Probandin fand sich eine mittlere Menge spezifischer IgE-Antikörper gegen Bienengift (CAP-RAST-Klasse 2) sowie eine niedrige Menge gegen Wespengift (CAP-RAST-Klasse 1) im Serum.

### 3.1.3 Ergebnisse der Hauttests

Bei 26 der 27 Patienten mit der Diagnose einer Wespengiftallergie waren Hauttests durchgeführt worden. Fünfundzwanzig Wespengiftallergiker zeigten eine positive Reaktion nach intrakutaner Injektion des verdünnten Wespengiftes. Bei einem wespengiftallergischen Patienten (Nr. 13) trat zusätzlich eine positive Reaktion auf Bienengift auf. Die Reaktion wurde allerdings erst bei der höchsten eingesetzten Giftkonzentration von  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$  beobachtet.

Alle 5 untersuchten Bienengiftallergiker reagierten auf die intrakutane Applikation des verdünnten Bienengiftes positiv. Auch hier fand sich ein Patient (Nr. 31) mit zusätzlichem positivem Hauttest auf Wespengift bei einer Konzentration von  $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ .

Acht der 9 Patienten, bei denen eine Allergie gegen beide Insektengifte diagnostiziert wurde, waren einer Hauttestung unterzogen worden. Davon wiesen 7 Patienten positive Hauttestergebnisse auf beide Gifte auf. Ein Patient (Nr. 26) reagierte nur auf Wespen-, nicht auf Bienengift.

## **3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der CD203c-Expression der Basophilen**

### **3.2.1 CD203c-Expression der basophilen Granulozyten vor Allergenstimulation**

Zur Abschätzung der durchschnittlichen CD203c-Expression der basophilen Granulozyten vor Allergenstimulation wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der 97A6-positiven Zellen nach Stimulation mit PBS ( $MFI_{PBS}$ ) herangezogen.

In der Gruppe der Bienengiftallergiker ( $n=5$ ) traten mediane Fluoreszenzintensitäten von minimal 41,4 bis maximal 252,6 auf (Tabelle 7, 2. Spalte). Der geometrische Mittelwert lag bei einer MFI von 99,5.

Die wespengiftallergischen Patienten ( $n=27$ ) zeigten Extremwerte der  $MFI_{PBS}$  von 46,6 bis 562,3 (Tabelle 8, Spalte 2). Der geometrische Mittelwert der MFI nahm einen Wert von 126,3 an.

Bei den Patienten mit der Diagnose einer Allergie auf beide Insektengifte ( $n=9$ ) fanden sich mediane Fluoreszenzintensitäten von 63,5 bis 181,1 (Tabelle 9, Spalte 2). Das geometrische Mittel lag bei einer  $MFI_{PBS}$  von 106,6.

Die Analyse der  $MFI_{PBS}$ -Werte der Kontrollpersonen ( $n=9$ ) erbrachte ein Minimum von 40,7 und ein Maximum von 200,8 (Tabelle 10, Spalte 2). Der geometrische Mittelwert lag bei 91,7.

Der Vergleich der geometrischen Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensitäten nach Stimulation mit PBS ( $MFI_{PBS}$ ) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Allergikergruppen und den Kontrollpersonen.

### 3.2.2 Allergeninduzierte Hochregulation von CD203c

#### *Reaktion der bienengiftallergischen Patienten*

Bei den 5 bienengiftallergischen Patienten traten nach Stimulation mit rohem Bienengift mediane Fluoreszenzintensitäten von minimal 403,2 bis maximal 716,9 (MW  $538 \pm SD 126,1$ ; Median 478,3) auf. Der Stimulationsindex (SI) variierte von 2,2 bis 11,5 (MW  $6,5 \pm SD 3,1$ ; Median 6,0). In dieser Gruppe führte die Stimulation mit rohem Bienengift zu einer signifikanten Zunahme der CD203c-Expression gegenüber der Stimulation mit PBS ( $p < 0,05$ ). Eine positive Reaktion ( $SI > 1,3$ ) konnte für alle 5 Patienten nachgewiesen werden (Tabelle 7 und Abbildung 4).

Als Reaktion auf rohes Wespengift ergaben sich mediane Fluoreszenzintensitäten von 49,8 bis 218,7 (MW  $115,4 \pm SD 72,3$ ; Median 89,9). Die Stimulationsindices nahmen Werte von 0,6 bis 1,2 (MW  $1,0 \pm SD 0,2$ ; Median 1,0) an; eine positive Reaktion auf rohes Wespengift ( $SI > 1,3$ ) konnte bei keinem der als Bienengiftallergiker diagnostizierten Patienten nachgewiesen werden. Die CD203c-Expression nach Stimulation mit rohem Wespengift unterschied sich nicht signifikant von der CD203c-Expression nach Stimulation mit PBS (Tabelle 7 und Abbildung 4).

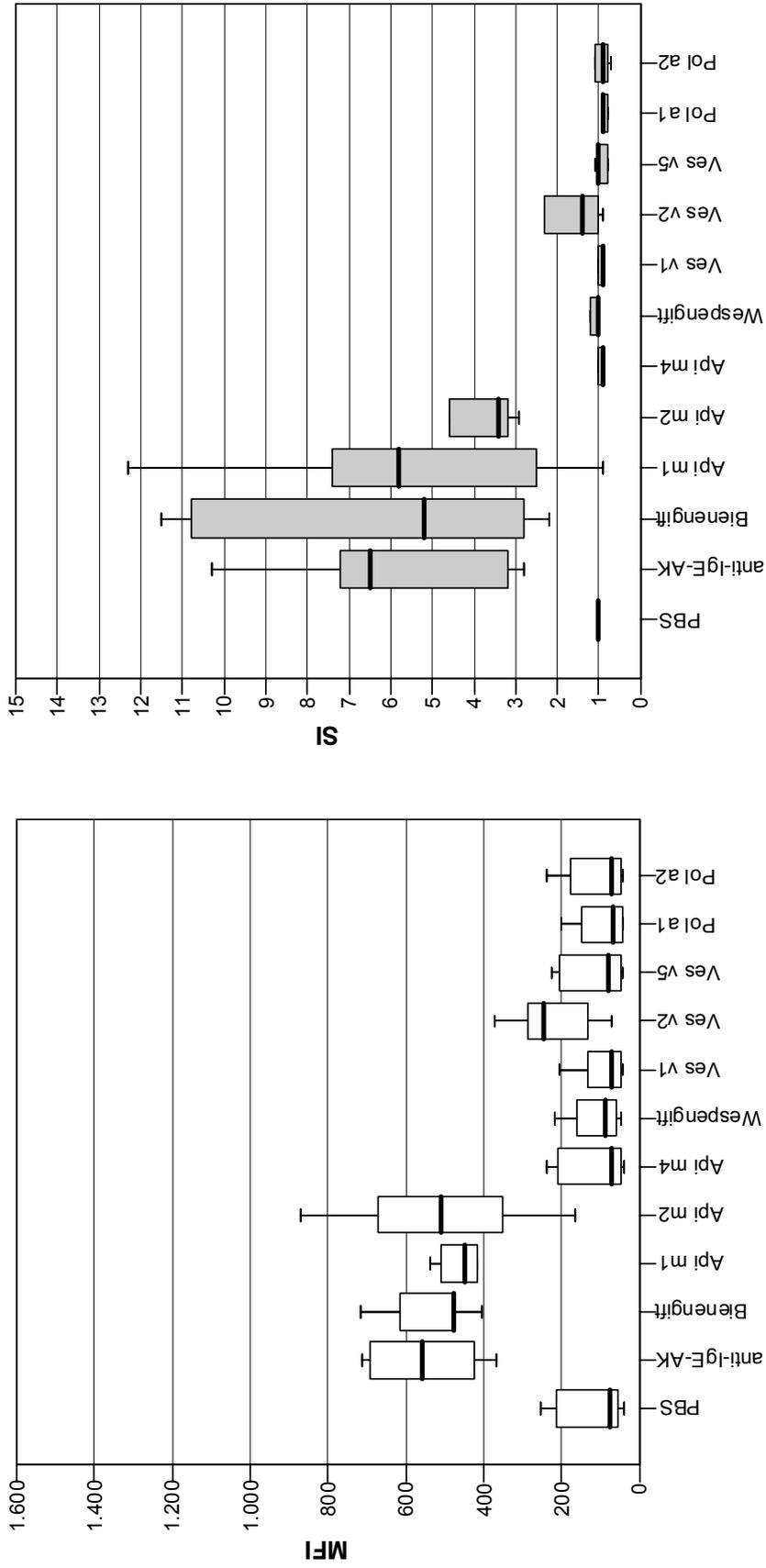
Vier Bienengiftallergiker reagierten positiv auf die Bienengiftkomponente Api m1 (Phospholipase A<sub>2</sub>). Fünf reagierten positiv auf die Bienengiftkomponente Api m2 (Bienenhyaluronidase). Im Gegensatz dazu konnte bei keinem der 5 Patienten eine Reaktion auf das Nebenallergen Api m4 (Melittin) beobachtet werden.

Bei 3 der 5 Bienengiftallergiker (Nr. 8, 31, 37) zeigte sich eine Sensibilisierung gegen die Wespengiftkomponente Ves v2 (Hyaluronidase), obgleich keine Reaktion auf das rohe Wespengift nachgewiesen werden konnte.

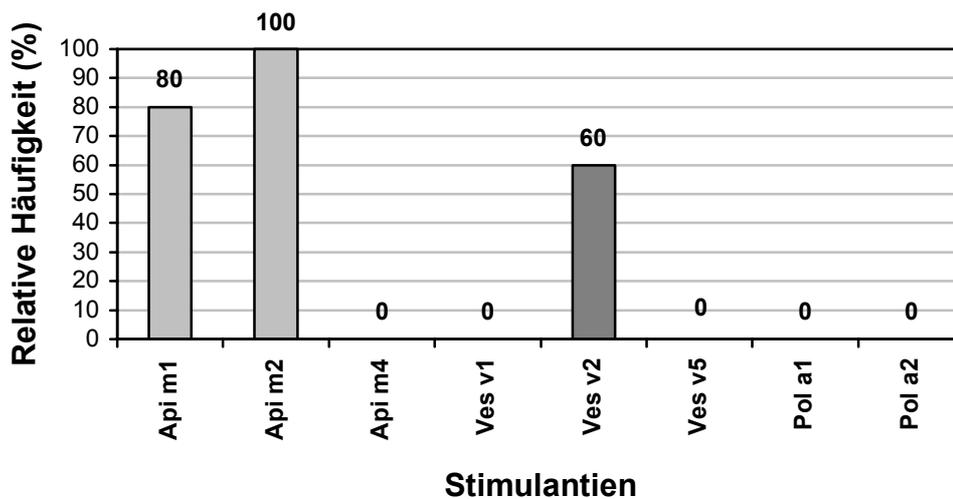
Positive Reaktionen auf die beiden anderen Wespengiftproteine oder auf die gereinigten Proteine des Papierwespengiftes konnten nicht verzeichnet werden (Zur Häufigkeit positiver Reaktionen auf die Einzelkomponenten bei den Bienengiftallergikern siehe Abbildung 5).

**Tabelle 7: Bienengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI der 97A6-positiven Zellen nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Allergenen.** Als Maß der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten wurde die Mediane Fluoreszenzintensität MFI der 97A6-positiven Zellen nach Markierung mit CD203c-spezifischem Antikörper 97A6-PE bestimmt. Dies erfolgte nach vorhergehender Stimulation mit rohem Bienen- (B) oder Wespengift (W), den Bienengiftproteinen Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1), Hyaluronidase (Api m2), Melittin (Api m4), den Wespen-giftproteinen Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1), Hyaluronidase (Ves v2), Antigen 5 (Ves v5) und den Papierwespengiftkomponenten Phospholipase (Pol a1), Hyaluronidase (Pol a2). Konzentration aller Stimulanzien 1 µg/ml. Als Negativkontrolle diente PBS, als Positivkontrolle 1 µg/ml Anti-IgE-Antikörper (a-IgE). Der Stimulationsindex errechnete sich wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt.

| Pat. Nr. | Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI nach Stimulation mit |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|          | PBS   | a-IgE       | B           | Api m1      | Api m2      | Api m4      | W           | Ves v1      | Ves v2      | Ves v5      | Pol a1      | Pol a2      |
| 8        | 212,9 / 1   | 691,6 / 3,2 | 478,3 / 2,2 | 537,6 / 2,5 | 673,2 / 3,2 | 211 / 1     | 218,7 / 1   | 205,4 / 1   | 287,7 / 1,4 | 224,7 / 1,1 | 201,7 / 0,9 | 237,1 / 1,1 |
| 12       | 252,6 / 1   | 710,5 / 2,8 | 716,9 / 2,8 | 224,7 / 0,9 | 869,9 / 3,4 | 237,1 / 0,9 | 160,4 / 0,6 | 134,6 / 0,5 | 248,1 / 1   | 205,4 / 0,8 | 148,6 / 0,6 | 179,4 / 0,7 |
| 31       | 56,7 / 1  | 368,5 / 6,5 | 615 / 10,8  | 417,9 / 7,4 | 167 / 2,9   | 47,6 / 0,9  | 58,3 / 1    | 49,8 / 0,9  | 131 / 2,3   | 47,6 / 0,8  | 43,7 / 0,8  | 43,3 / 0,8  |
| 36       | 77 / 1  | 557,3 / 7,2 | 403,2 / 5,2 | 449,1 / 5,8 | 352,3 / 4,6 | 70,4 / 0,9  | 89,8 / 1,2  | 72,3 / 0,9  | 71,1 / 0,9  | 80,6 / 1    | 69,8 / 0,9  | 72,3 / 0,9  |
| 37       | 41,4 / 1  | 426 / 10,3  | 476 / 11,5  | 509 / 12,3  | 509 / 12,3  | 40,7 / 1    | 49,8 / 1,2  | 43,3 / 1    | 371,8 / 9   | 42,2 / 1    | 44,9 / 1,1  | 47,2 / 1,1  |

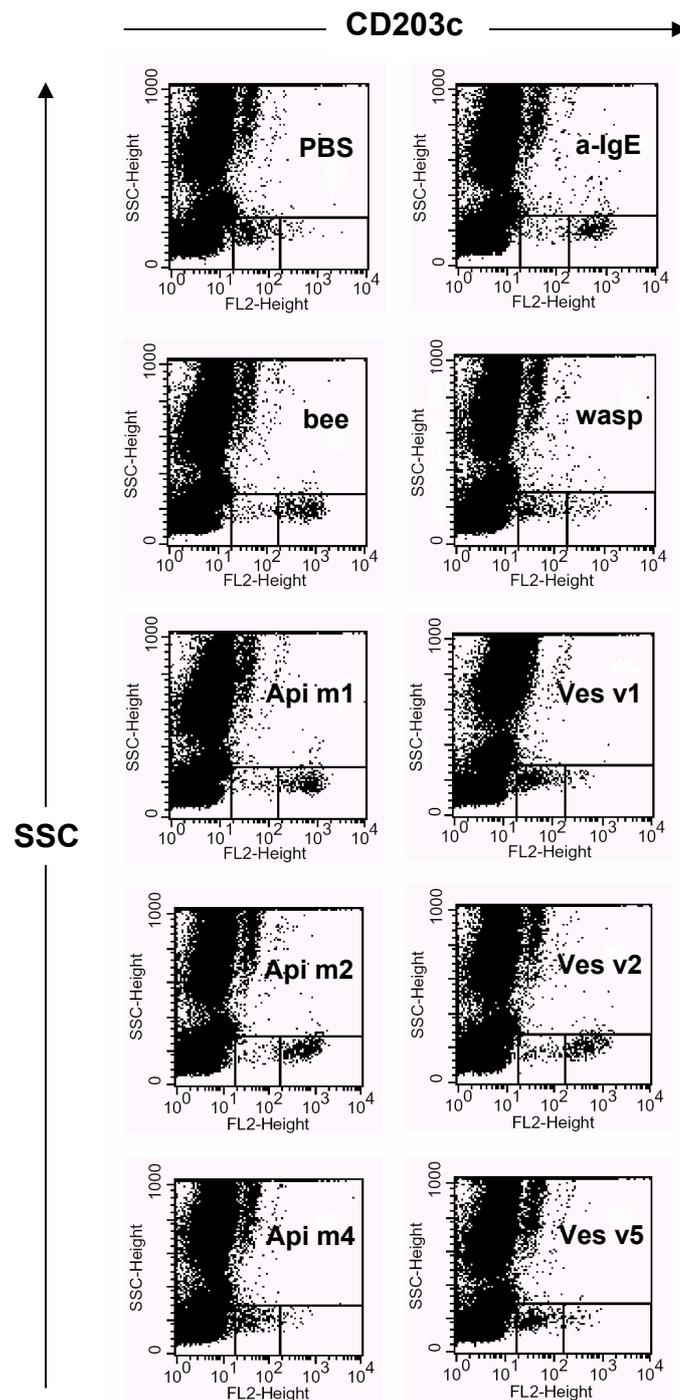


**Abbildung 4:** Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (links) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (rechts) bei den 5 Bienengiftallergikern nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Für jedes Stimulans sind der Median der MFI (fette, horizontale Linie), das Wertintervall von der 25%- bis zur 75%-Perzentile (weiß bzw. grau hinterlegter Kasten) und das Minimum und Maximum dargestellt.



**Abbildung 5: Relative Häufigkeit einer positiven Reaktion auf die Insektengiftproteine (%) bei den Bienengiftallergikern (n=5).**

Abbildung 6 zeigt exemplarisch für die Bienengiftallergiker die Punktwolken-  
diagramme des Patienten Nummer 37. Erwartungsgemäß ließ sich eine Zu-  
nahme der CD203c-Expression nachweisen, nachdem die Zellen mit Anti-IgE-  
Antikörper oder rohem Bienengift stimuliert worden waren, während rohes  
Wespengift keine Veränderung der CD203c-Expression bewirkte. Zusätzlich  
führten die Bienengiftproteine Api m1 und Api m2 zu einer verstärkten Expres-  
sion von CD203c, nicht jedoch Api m4, Ves v1 oder Ves v5. Bemerkenswerter-  
weise reagierte dieser Patient auch auf die Wespengiftkomponente Ves v2, ob-  
wohl bei ihm keine Wespengiftallergie diagnostiziert worden war.



**Abbildung 6: Hochregulierung der CD23c-Expression auf den basophilen Granulozyten eines Bienengiftallergikers.** Periphere Blutzellen (80 $\mu$ l) eines bienengiftallergischen Patienten (Pat Nr.37) wurden mit PBS (Negativkontrolle), Anti-IgE-Antikörper (Positivkontrolle), Bienen- oder Wespengiftextrakt, den gereinigten Bienengiftkomponenten Api m1, Api m2, Api m4 oder den Wespengiftkomponenten Ves v1, Ves v2 oder Ves v5 inkubiert. Nach Markierung der Zellen mit dem CD23c-spezifischen monoklonalen Antikörper 97A6-PE und Erythrozytenlyse wurden für jeden Ansatz 50.000 Zellen auf einem FACSCalibur Durchflusszytometer untersucht. Für die Zellen wurden im Punkthistogramm die Parameter Seitwärtsstreuung (SSC) und Fluoreszenz (FL2) des monoklonalen Antikörpers 97A6-PE (Anti-CD23c) dargestellt und mit Hilfe der Cellquest Software ausgewertet.

### *Reaktion der wespengiftallergischen Patienten*

Bei den 27 Wespengiftallergikern führte die Stimulation der basophilen Granulozyten mit rohem Wespengift zu medianen Fluoreszenzintensitäten von minimal 63,8 bis maximal 2571 (MW 756,4 ± SD 619,7; Median 604,3). Der Stimulationsindex (SI) – Parameter für die Hochregulation der CD203c-Expression – variierte von 0,8 bis 12,2 (MW 5,2 ± SD 3,2; Median 4,8). Es ließ sich zeigen, dass innerhalb der Gruppe der Wespengiftallergiker die Stimulation mit rohem Wespengift zu einer signifikanten Zunahme der CD203c-Expression gegenüber den PBS-stimulierten Negativkontrollen führte ( $p < 0,05$ ). Vierundzwanzig der 27 wespengiftallergischen Patienten wiesen eine positive Reaktion ( $SI > 1,3$ ) auf rohes Wespengift auf. Drei Patienten (Nr. 10, 16, 33) zeigten keine, einer (Nr. 25) nur eine geringfügige Erhöhung der CD203c-Expression ( $SI = 1,4$ ) auf rohes Wespengift. Die Basophilen dieser Patienten zeigten ebenso wenig eine Erhöhung der CD203c-Expression nach Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper oder einem der anderen eingesetzten Allergene. Sie wurden daher als Nonresponder eingestuft (Tabelle 8 und Abbildung 7).

Als Reaktion auf rohes Bienengift konnten mediane Fluoreszenzintensitäten von 45,9 bis 575,1 (MW 133,2 ± SD 101,5. Median 118,1) nachgewiesen werden. Die Stimulationsindices nahmen Werte von 0,6 bis 1,2 (MW 0,9 ± SD 0,2; Median 0,9) an; eine positive Reaktion auf rohes Bienengift ( $SI > 1,3$ ) konnte für keinen der als Wespengiftallergiker diagnostizierten Patienten gezeigt werden. Die CD203c-Expression nach Stimulation mit rohem Bienengift unterschied sich nicht signifikant von der CD203c-Expression nach Stimulation mit PBS (Tabelle 8 und Abbildung 7).

Die wespengiftallergischen Patienten, deren basophile Granulozyten sich durch rohes Wespengift stimulieren ließen, zeigten auf wenigstens eines der getesteten singulären Wespengiftproteine eine positive Reaktion ( $SI > 1,3$ ). Drei der Patienten reagierten mit nur einem Protein, 7 mit zwei Proteinen, 13 mit allen drei eingesetzten Wespengiftproteinen. Die häufigste Reaktion wurde gegen rekombinantes Antigen 5 Ves v5 (20 Patienten, 87%) beobachtet, gefolgt von Reakti-

onen auf Wespenhyaluronidase Ves v2 (18 Patienten, 78%) und Phospholipase A<sub>1</sub> Ves v1 (17 Patienten, 74%).

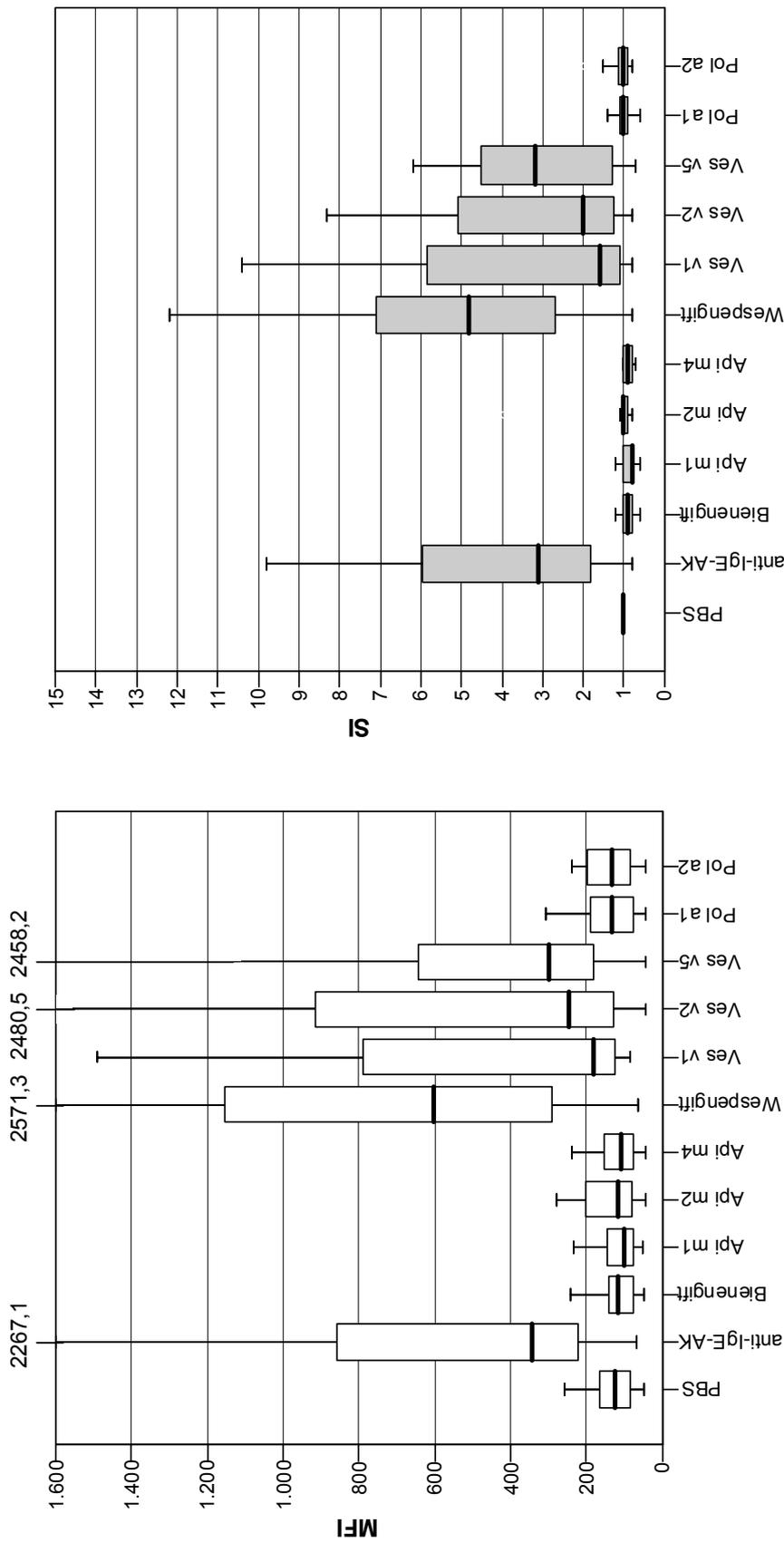
Interessanterweise wiesen 3 (13%) der Wespengiftallergiker (Pat. Nr. 1, 17 und 41) auch eine Erhöhung der CD203c-Expression nach Stimulation mit Bienenhyaluronidase (A<sub>pi</sub> m2) auf. In diesen Fällen war gleichzeitig eine Reaktion auf die homologe Wespenhyaluronidase Ves v2 zu verzeichnen.

Positive Reaktionen auf die beiden gereinigten Proteine des Papierwespengiftes kamen 7 Mal vor – davon 3 gegen Pol a1 (13%) und 4 gegen Pol a2 (17%). (Zur Häufigkeit positiver Reaktionen auf die Einzelkomponenten bei den Wespengiftallergikern siehe Abbildung 8).

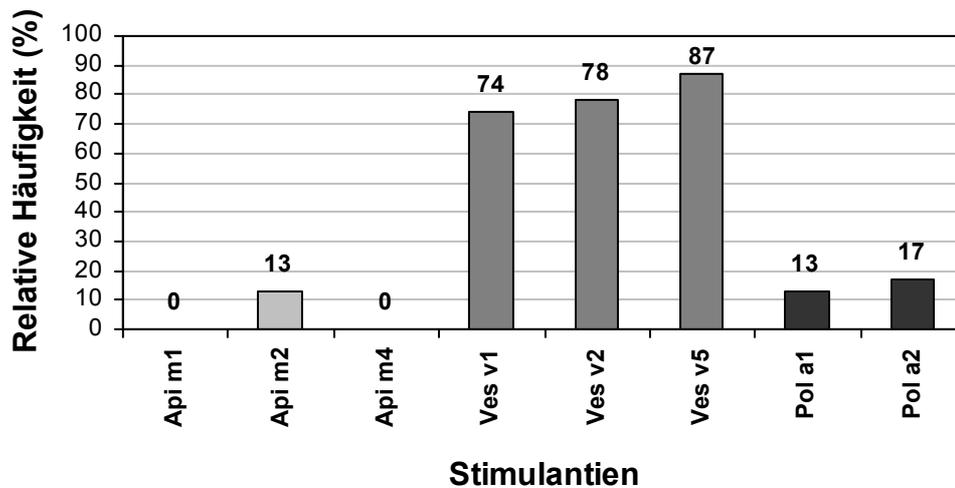
**Tabelle 8: Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI der 97A6-positiven Zellen nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Als Maß der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper bzw. den Allergenen wurde die Mediane Fluoreszenzintensität MFI der 97A6-positiven Zellen bestimmt. Zuvor war eine Markierung mit CD203c-spezifischem Antikörper 97A6-PE erfolgt. Der Stimulationsindex errechnete sich wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt. (Abkürzungen siehe Tabelle 7).**

| Pat. Nr. | Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI nach Stimulation mit |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |  |
|----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
|          | PBS   | a-IgE       | B           | Api m1      | Api m2      | Api m4      | W           | Ves v1      | Ves v2      | Ves v5      | Pol a1      | Pol a2      |  |
| 1        | 562,4 / 1   | 2267 / 4    | 575,1 / 1   | 403,2 / 0,7 | 1298 / 2,3  | 382 / 0,7   | 2571 / 4,6  | 710,5 / 1,3 | 2481 / 4,4  | 2458 / 4,4  | 509,4 / 0,9 | 1202 / 2,1  |  |
| 2        | 209,1 / 1   | 629,3 / 3   | 184,3 / 0,9 | 167 / 0,8   | 207,2 / 1   | 207,2 / 1   | 1596 / 7,6  | 1241 / 5,9  | 297 / 1,4   | 1046 / 5    | 281,3 / 1,3 | 212,9 / 1   |  |
| 4        | 123,5 / 1   | 310,6 / 2,5 | 98,2 / 0,8  | 74,7 / 0,6  | 106,5 / 0,9 | 92,6 / 0,7  | 469,8 / 3,8 | 115 / 0,9   | 248,1 / 2   | 378,6 / 3,1 | 96,5 / 0,8  | 106 / 0,9   |  |
| 6        | 257,1 / 1   | 1647 / 6,4  | 193,7 / 0,8 | 186,0 / 0,7 | 248,1 / 1   | 238,2 / 0,9 | 1304 / 5,1  | 1492, / 5,8 | 1009 / 3,9  | 1109 / 4,3  | 212,9 / 0,8 | 235 / 0,9   |  |
| 9        | 124,1 / 1   | 125,2 / 1   | 105,5 / 0,9 | 95,6 / 0,8  | 119,7 / 1   | 129,2 / 1   | 385,4 / 3,1 | 120,8 / 1   | 245,8 / 2   | 182,7 / 1,5 | 121,9 / 1   | 131 / 1     |  |
| 10       | 241,4 / 1   | 236,1 / 1   | 201,7 / 0,8 | 170,0 / 0,7 | 248,1 / 1   | 201,7 / 0,8 | 249,2 / 1   | 192,8 / 0,8 | 294,3 / 1,2 | 220,7 / 0,9 | 186,0 / 0,8 | 190,2 / 0,8 |  |
| 11       | 388,9 / 1   | 1065 / 2,7  | 243,6 / 0,6 | 235,0 / 0,6 | 392,4 / 1   | 317,7 / 0,8 | 1685 / 4,3  | 1263 / 3,2  | 1596 / 4,1  | 1685 / 4,3  | 307,8 / 0,8 | 523,3 / 1,3 |  |
| 13       | 135,8 / 1   | 816,8 / 6   | 86,6 / 0,6  | 120,8 / 0,9 | 116 / 0,9   | 103,7 / 0,8 | 626,4 / 4,6 | 127,5 / 0,9 | 1046 / 7,7  | 640,7 / 4,7 | 132,2 / 1   | 239,3 / 1,8 |  |
| 14       | 124,7 / 1   | 443,1 / 3,6 | 121,9 / 1   | 100,9 / 0,8 | 116,5 / 0,9 | 124,1 / 1   | 281,3 / 2,3 | 133,4 / 1,1 | 246,9 / 2   | 289,0 / 2,3 | 467,7 / 4,8 | 125,2 / 1   |  |
| 15       | 145,3 / 1   | 336,8 / 2,3 | 134 / 0,9   | 119,7 / 0,8 | 134,6 / 0,9 | 149,9 / 1   | 604,3 / 4,2 | 168,5 / 1,2 | 685,4 / 4,7 | 314,8 / 2,2 | 160,4 / 1,1 | 176,2 / 1,2 |  |
| 16       | 226,7 / 1   | 208,1 / 0,8 | 176,2 / 0,7 | 170,0 / 0,5 | 199,9 / 0,7 | 195,4 / 0,7 | 207,2 / 0,8 | 224,7 / 0,8 | 193,7 / 0,8 | 182,7 / 0,7 | 194,6 / 0,6 | 203,5 / 0,9 |  |
| 17       | 182,7 / 1   | 1018 / 5,6  | 148,6 / 0,8 | 168,5 / 0,9 | 278,8 / 1,5 | 155,4 / 0,9 | 1370 / 7,5  | 1219 / 6,7  | 1009 / 5,5  | 964,7 / 5,3 | 166,2 / 0,9 | 164 / 0,9   |  |

| Pat. Nr. | Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI nach Stimulation mit |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |  |
|----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
|          | PBS   | a-IgE       | B           | Api m1      | Api m2      | Api m4      | W           | Ves v1      | Ves v2      | Ves v5      | Pol a1      | Pol a2      |  |
| 18       | 142,0 / 1   | 342,9 / 2,4 | 113,4 / 0,8 | 107,5 / 0,8 | 145,9 / 1   | 124,7 / 0,9 | 749,9 / 5,3 | 138,2 / 1   | 1065 / 7,5  | 336,8 / 2,4 | 145,9 / 1   | 152,6 / 1,1 |  |
| 19       | 115,5 / 1   | 514 / 4,5   | 121,9 / 1,1 | 121,9 / 1,1 | 111,4 / 1   | 117,1 / 1   | 835,4 / 7,2 | 869,9 / 7,5 | 118,6 / 1   | 104,6 / 0,9 | 139,5 / 1,2 | 107,5 / 0,9 |  |
| 20       | 76,4 / 1  | 273,8 / 3,6 | 64,9 / 0,9  | 73,7 / 1    | 73,7 / 1    | 66,1 / 0,9  | 890 / 11,7  | 792 / 10,4  | 225,7 / 3   | 349,1 / 4,6 | 77 / 1      | 81,3 / 1,1  |  |
| 23       | 135,2 / 1   | 1160 / 8,6  | 118,1 / 0,9 | 102,3 / 0,8 | 124,1 / 0,9 | 128,6 / 1   | 1655 / 12,2 | 182,7 / 1,4 | 1526 / 11,3 | 1472 / 10,9 | 205,4 / 1,5 | 155,4 / 1,1 |  |
| 24       | 112,4 / 1   | 352,3 / 3,1 | 118,6 / 1,1 | 101,8 / 0,9 | 110,4 / 1   | 102,7 / 0,9 | 637,8 / 5,7 | 784,4 / 7   | 824,2 / 7,3 | 445,1 / 4   | 152,6 / 1,4 | 609,8 / 5,4 |  |
| 25       | 104,6 / 1   | 131 / 1,3   | 71,7 / 0,7  | 80,2 / 0,8  | 88,2 / 0,8  | 87,8 / 0,8  | 151,3 / 1,4 | 117,6 / 1,1 | 114,4 / 1,1 | 102,3 / 1   | 75,3 / 0,7  | 87,4 / 0,8  |  |
| 27       | 46,6 / 1  | 339,8 / 7,3 | 45,9 / 1    | 51,4 / 1,1  | 45,7 / 1    | 45,3 / 1    | 71,1 / 1,5  | 161,8 / 3,5 | 45,3 / 1    | 44,1 / 1    | 43,7 / 0,9  | 44,9 / 1    |  |
| 29       | 68,2 / 1  | 74,3 / 1,1  | 66,1 / 1    | 65,8 / 1    | 65,8 / 1    | 59,4 / 0,9  | 385,4 / 5,6 | 100 / 1,5   | 567,4 / 8,3 | 286,4 / 4,2 | 78,4 / 1,1  | 68,5 / 1    |  |
| 30       | 61,3 / 1  | 70,4 / 1,1  | 58,3 / 1    | 53,3 / 0,9  | 51,4 / 0,8  | 49,6 / 0,8  | 296,9 / 4,8 | 125,2 / 2   | 214,8 / 3,5 | 139,5 / 2,3 | 59,9 / 1    | 52,8 / 0,9  |  |
| 33       | 70,4 / 1  | 66,4 / 0,9  | 68,5 / 1    | 77,7 / 1,1  | 61,5 / 0,9  | 63,8 / 0,9  | 63,78 / 0,9 | 82,42 / 1,2 | 78,8 / 1,1  | 71,69 / 1,1 | 64,9 / 0,9  | 63,2 / 0,9  |  |
| 34       | 54,3 / 1  | 322 / 5,9   | 52,8 / 1    | 52,8 / 1    | 52,8 / 1    | 48,7 / 0,9  | 368,5 / 6,8 | 87,4 / 1,6  | 72,3 / 1,3  | 199 / 3,7   | 50,5 / 0,9  | 58,6 / 1    |  |
| 35       | 65,5 / 1  | 167 / 2,5   | 77 / 1,2    | 72,34 / 1,1 | 66,1 / 1    | 60,4 / 0,9  | 457,3 / 7   | 500,3 / 7,6 | 101,5 / 1,5 | 299,6 / 4,6 | 70,4 / 1,1  | 69,2 / 1,1  |  |
| 38       | 89 / 1  | 679,3 / 7,6 | 90,58 / 1   | 108,5 / 1,2 | 94,8 / 1,1  | 88,6 / 1    | 205,4 / 2,3 | 163,3 / 1,9 | 140,8 / 1,6 | 283,9 / 3,2 | 100 / 1,1   | 114,4 / 1,2 |  |
| 39       | 138,9 / 1   | 1358 / 9,8  | 137 / 1     | 108 / 0,8   | 142 / 1     | 110,4 / 0,8 | 1286 / 9,3  | 1407 / 10,1 | 105,1 / 0,8 | 109,4 / 0,8 | 127,5 / 0,9 | 105,1 / 0,8 |  |
| 41       | 103,2 / 1   | 897,7 / 8,7 | 122,4 / 1,2 | 95,6 / 0,9  | 425,5 / 4,1 | 86,6 / 0,8  | 1018 / 9,9  | 528 / 4,1   | 593,5 / 5,8 | 643,6 / 6,2 | 123 / 1,2   | 154 / 1,5   |  |

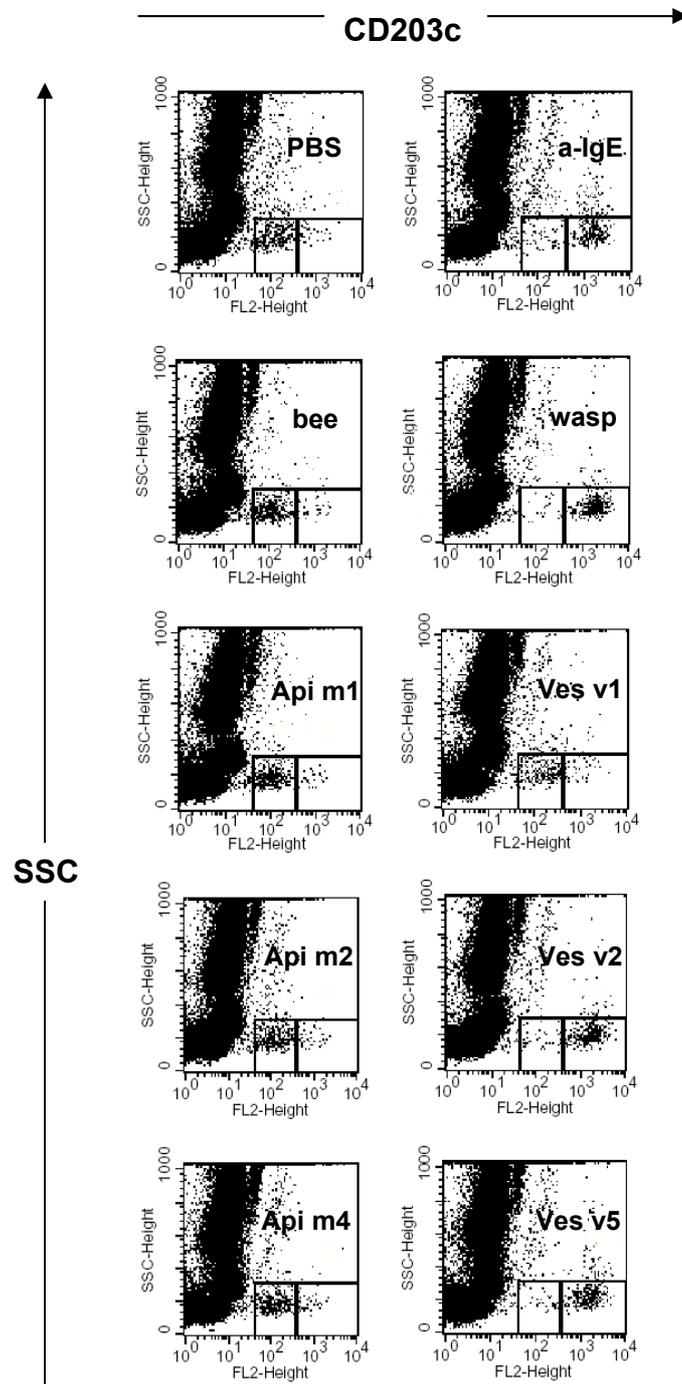


**Abbildung 7:** Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (links) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (rechts) bei den 27 Wespengiftallergikern nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Für jedes Stimulans sind der Median der MFI (fette, horizontale Linie), das Wertebereich von der 25%- bis zur 75%-Perzentile (weiß bzw. grau hinterlegter Kasten) und das Minimum und Maximum dargestellt.



**Abbildung 8:** Relative Häufigkeit einer positiven Reaktion auf die verschiedenen Insektengiftproteine (%) bei den Wespengiftallergikern (n=27).

Die Punktwolkendiagramme in Abbildung 9 zeigen, repräsentativ für die Wespengiftallergiker, die CD203c-Expression der mononukleären Zellen eines wespengiftallergischen Patienten (Nr.13) nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Wie erwartet führte die Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper (Positivkontrolle) und rohem Wespengift zur Zunahme der CD203c-Expression. Die Stimulation mit rohem Bienengift konnte dagegen die CD203c-Expression nicht beeinflussen. Unter Verwendung definierter Giftproteine ließ sich bei diesem Patienten eine Sensibilisierung gegen die Wespengiftallergene Ves v2 und Ves v5, nicht aber gegen Ves v1 oder eine der Bienengiftkomponenten nachweisen.



**Abbildung 9: Hochregulierung der CD203c-Expression auf den basophilen Granulozyten eines Wespengiftallergikers.** Die Stimulation der Basophilen und Evaluation der CD203c-Expression wurden durchgeführt wie in Abbildung 6 beschrieben.

#### *Reaktion der bienen- und wespengiftallergischen Patienten*

Bei 9 der 42 untersuchten Individuen war aufgrund der Standarddiagnostik eine Allergie gegen beide Insektengifte diagnostiziert worden. Bei diesen Personen zeigten sich nach Stimulation mit rohem Bienengift mediane Fluoreszenzintensitäten von minimal 84,3 bis maximal 1286 (MW 509,6 ± SD 357,5; Median 562,3). Der Stimulationsindex (SI) wies Werte von 1,1 bis 10,5 (MW 4,7 ± SD 3,2; Median 4,0) auf. Eine positive Reaktion (SI>1,3) konnte für 7 der 9 Patienten nachgewiesen werden. Die Stimulation mit rohem Bienengift führte zu einer signifikanten Zunahme der CD203c-Expression gegenüber der PBS-stimulierten Negativkontrollen (p<0,05) (siehe Tabelle 9 und Abbildung 10).

Als Reaktion auf rohes Wespengift ergaben sich mediane Fluoreszenzintensitäten von 414,2 bis 973,4 (MW 644,7 ± SD 178,1, Median 598,9). Die Stimulationsindices nahmen Werte von 2,7 bis 8,9 (MW 6,3 ± SD 2,2; Median 6,6) an. Eine positive Reaktion auf rohes Wespengift (SI>1,3) konnte demnach bei allen 9 Patienten gezeigt werden. Die Höhe der CD203c-Expression nach Stimulation mit rohem Wespengift unterschied sich signifikant von jener der PBS-stimulierten Negativkontrollen (p<0,05) (siehe Tabelle 9 und Abbildung 10).

Die relativen Häufigkeiten positiver Reaktionen auf die Einzelkomponenten bei den Bienen- und Wespengiftallergikern ist in Abbildung 11 dargestellt.

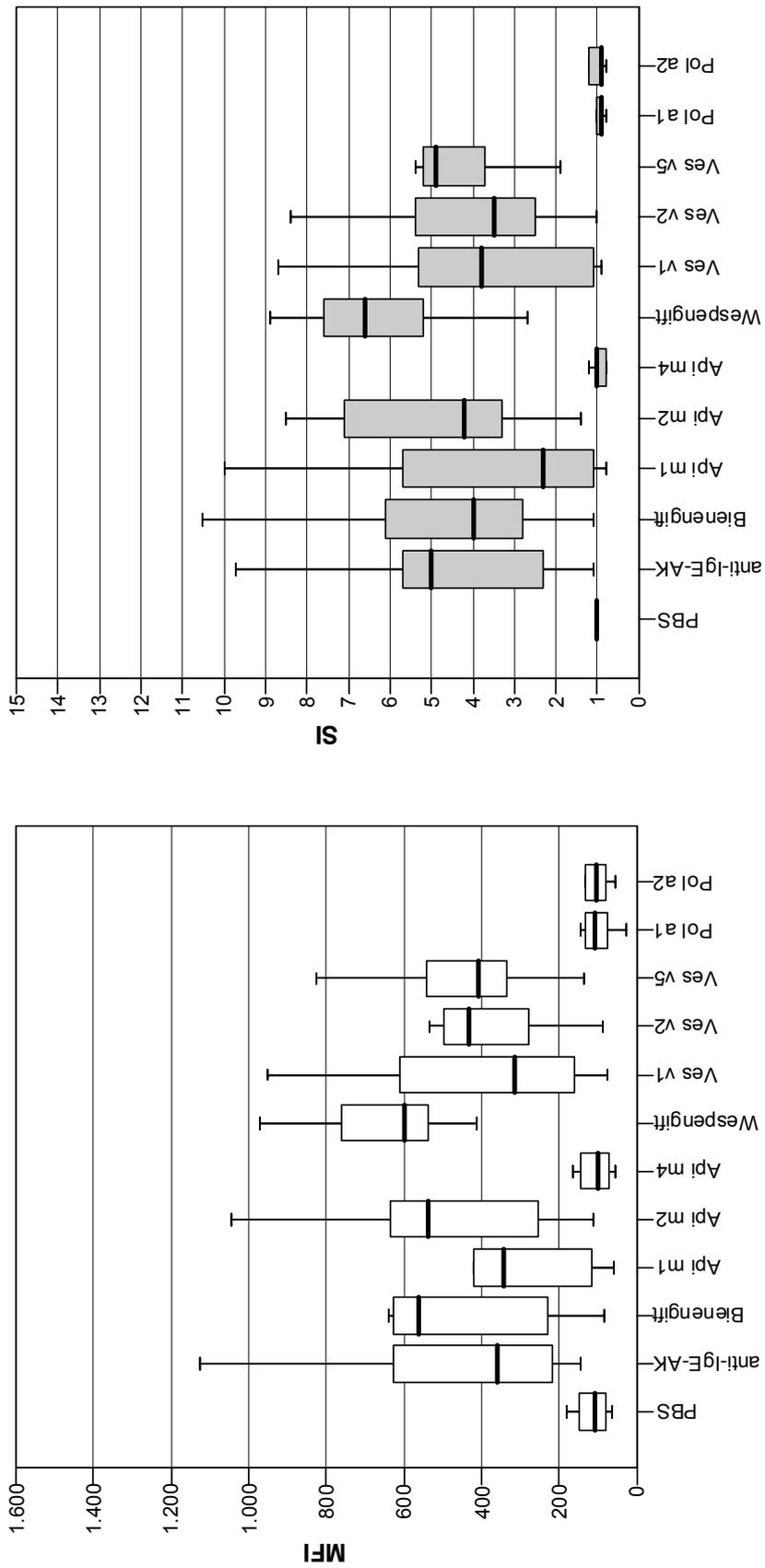
Eine positive Reaktion auf die Bienengiftkomponente Api m1 konnte bei 5 der 9 Patienten (56%) verzeichnet werden. Positive Reaktionen auf Api m2 kamen bei allen 9 Patienten (100%) vor, wohingegen Sensibilisierungen gegen Api m4 auch in diesem Patientenkollektiv nicht nachzuweisen waren.

Auf die Wespengiftproteine Ves v1 gab es 6 (67%), gegen Ves v2 acht (89%) und gegen Ves v5 ebenfalls 8 (89%) positive Reaktionen.

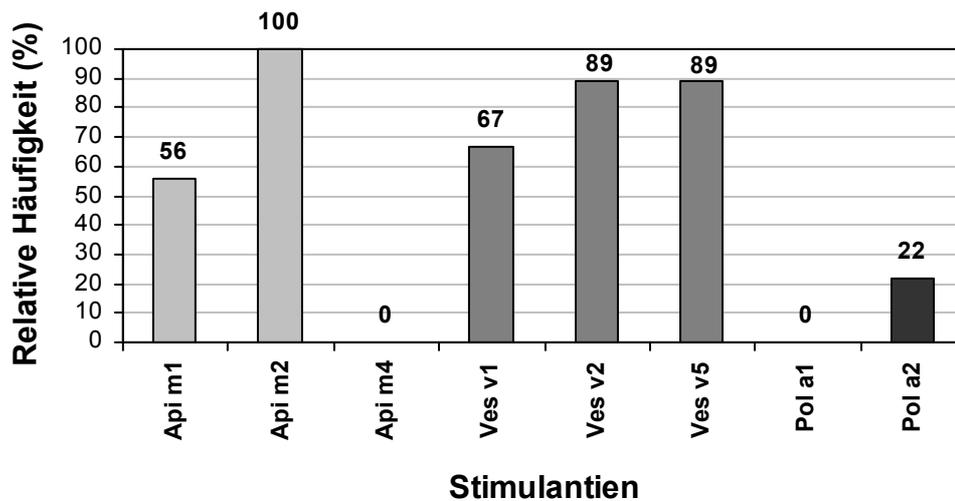
Bei den Papierwespengiftproteinen fand sich keine positive Reaktion auf Pol a1. Zwei positive Reaktionen (22%) wurden auf Pol a2 beobachtet.

**Tabelle 9: Bienen- und Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI der 97A6-positiven Zellen nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen.** Als Maß der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper bzw. den Allergenen wurde die Mediane Fluoreszenzintensität MFI der 97A6-positiven Zellen bestimmt. Zuvor war eine Markierung mit CD203c-spezifischem Antikörper 97A6-PE erfolgt. Der Stimulationsindex errechnete sich wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt. Abkürzungen der Allergene: Rohes Bienengift (B), rohes Wespengift (W). Biengiftproteine: Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1), Hyaluronidase (Api m2), Melittin (Api m4). Wespengiftproteine: Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1), Hyaluronidase (Ves v2), Antigen 5 (Ves v5). Papierwespengiftkomponenten: Phospholipase (Pol a1), Hyaluronidase (Pol a2).

| Pat. Nr. | Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI nach Stimulation mit |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |  |
|----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
|          | PBS   | a-IgE       | B           | Api m1      | Api m2      | Api m4      | W           | Ves v1      | Ves v2      | Ves v5      | Pol a1      | Pol a2      |  |
| 3        | 147,2 / 1   | 358,7 / 2,4 | 582,9 / 4   | 344,4 / 2,3 | 615,3 / 4,2 | 143,3 / 1   | 760,1 / 5,2 | 784,4 / 5,3 | 371,8 / 2,5 | 542,5 / 3,7 | 139,5 / 0,9 | 131 / 0,9   |  |
| 5        | 78,4 / 1  | 412,3 / 5,3 | 84,3 / 1,1  | 84,3 / 1,1  | 111,4 / 1,4 | 92,2 / 1,2  | 679,3 / 8,7 | 75 / 1      | 277,6 / 3,5 | 406,8 / 5,2 | 77,7 / 1    | 93,1 / 1,2  |  |
| 7        | 123 / 1   | 1124 / 9,7  | 1286 / 10,5 | 1230 / 10   | 1046 / 8,5  | 102,3 / 0,8 | 809,5 / 6,6 | 129,8 / 1,1 | 433,2 / 3,5 | 661,2 / 5,4 | 109,4 / 0,9 | 105,5 / 0,9 |  |
| 21       | 109,4 / 1   | 626,4 / 5,7 | 396 / 3,6   | 145,9 / 1,3 | 835,4 / 7,6 | 111,4 / 1   | 973,4 / 8,9 | 951,7 / 8,7 | 914 / 8,4   | 827,9 / 7,6 | 133,4 / 1,2 | 239,3 / 2,2 |  |
| 22       | 181,1 / 1   | 217,7 / 1,2 | 230,8 / 1,3 | 1027 / 5,7  | 634,9 / 3,5 | 145,9 / 0,8 | 557,3 / 3,1 | 161,1 / 0,9 | 532,8 / 2,9 | 342,9 / 1,9 | 145,9 / 0,8 | 333,8 / 1,8 |  |
| 28       | 63,5 / 1  | 143,3 / 2,3 | 179,4 / 2,8 | 59,4 / 0,9  | 207,2 / 3,3 | 57,3 / 0,9  | 471,9 / 7,4 | 215,8 / 3,4 | 88,2 / 1,4  | 330,8 / 5,2 | 27,9 / 0,9  | 57,3 / 0,9  |  |
| 32       | 70,7 / 1  | 357,1 / 5   | 637,8 / 9   | 419,8 / 5,9 | 504,8 / 7,1 | 67,9 / 1    | 537,6 / 7,6 | 316,2 / 4,5 | 487 / 6,9   | 336,8 / 4,8 | 70,7 / 1    | 81,3 / 1,1  |  |
| 26       | 92,2 / 1  | 667,1 / 7,2 | 562,3 / 6,1 | 416,1 / 4,5 | 537,6 / 5,8 | 72,7 / 0,8  | 598,9 / 6,5 | 609,8 / 6,6 | 495,8 / 5,4 | 453,2 / 4,9 | 88,2 / 1    | 75,7 / 0,8  |  |
| 42       | 151,9 / 1   | 173,9 / 1,1 | 626,4 / 4,1 | 115,5 / 0,8 | 254,8 / 1,7 | 164 / 1,1   | 414,2 / 2,7 | 577,7 / 3,8 | 151,3 / 1   | 137 / 0,9   | 125,2 / 0,8 | 125,2 / 0,8 |  |

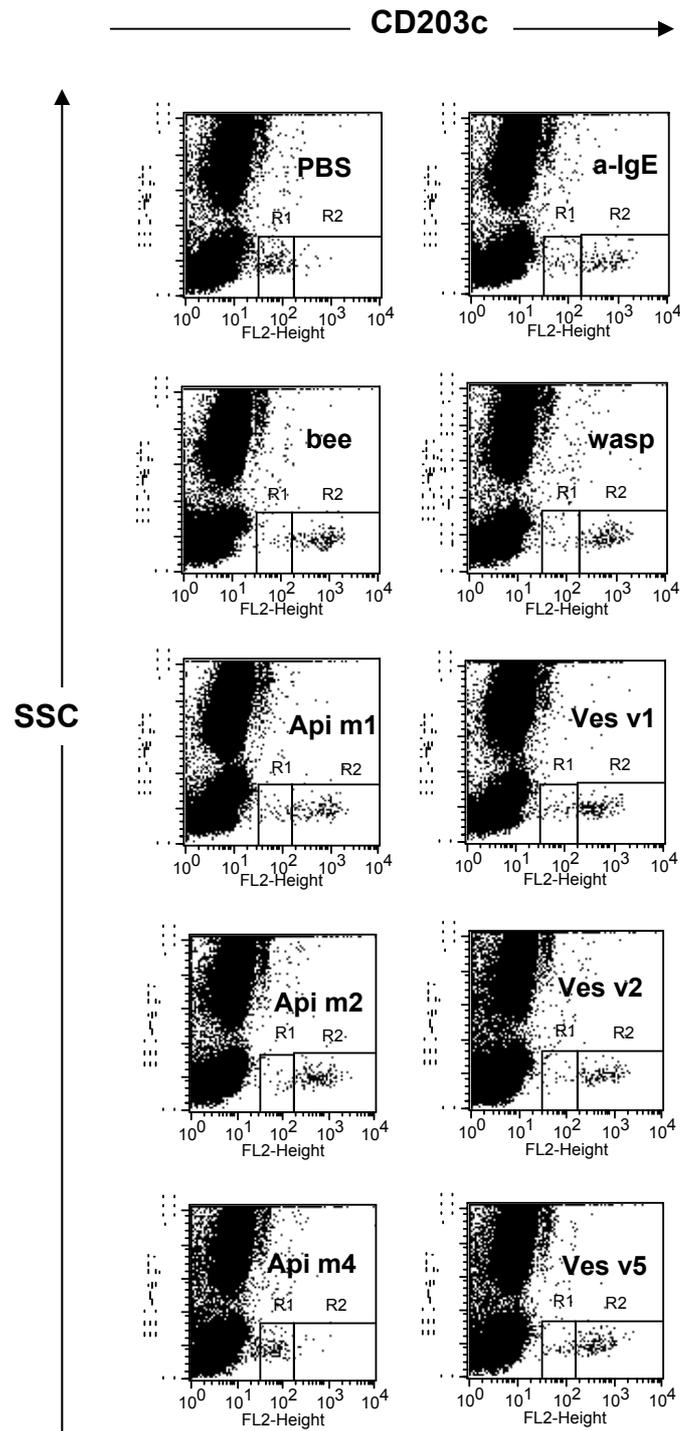


**Abbildung 10:** Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (links) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (rechts) bei den 9 Bienen- und Wespengiftallergikern nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Für jedes Stimulans sind der Median der MFI (fette, horizontale Linie), das Wertintervall von der 25%- bis zur 75%-Perzentile (weiß bzw. grau hinterlegter Kas-ten) und das Minimum und Maximum dargestellt.



**Abbildung 11: Relative Häufigkeit einer positiven Reaktion auf die verschiedenen Insektengiftproteine (%) bei den Bienen- und Wespengiftallergikern (n=9).**

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse eines bienen- und wespengiftallergischen Patienten (Pat. Nr. 3). Eine Zunahme der CD203c-Expression ließ sich nach Stimulation der Zellen mit Anti-IgE-Antikörper, rohem Bienengift oder rohem Wespengift verzeichnen. Zusätzlich führten die Bienengiftproteine Api m1 und Api m2 sowie die Wespengiftkomponenten Ves v1, Ves v2 und Ves v5 zu einer verstärkten Expression von CD203c. Keine Änderung der CD203c-Expression fand sich jedoch nach Stimulation mit Api m4.



**Abbildung 12: Hochregulierung der CD203c-Expression auf den basophilen Granulozyten eines Bienen- und Wespengiftallergikers. Die Stimulation der Basophilen und Evaluation der CD203c-Expression wurden durchgeführt wie in Abbildung 6 beschrieben.**

### *Reaktion der Kontrollpersonen*

Neun gesunde Personen ohne bekannte Allergie wurden als Kontrollen untersucht. Bei ihnen zeigten sich nach Stimulation mit rohem Bienengift mediane Fluoreszenzintensitäten von minimal 40 bis maximal 124,1 (MW 79,5 ± SD 27,8; Median 79,7). Der Stimulationsindex (SI) wies Werte von 0,6 bis 1,0 (MW 0,8 ± SD 0,2; Median 0,8) auf. Eine positive Reaktion (SI>1,3) konnte für keine der 9 Kontrollen nachgewiesen werden. Der Stimulationsindex nach Stimulation mit rohem Bienengift zeigte keinen Unterschied gegenüber dem Stimulationsindex der PBS-stimulierten Proben (Tabelle 10 und Abbildung 13).

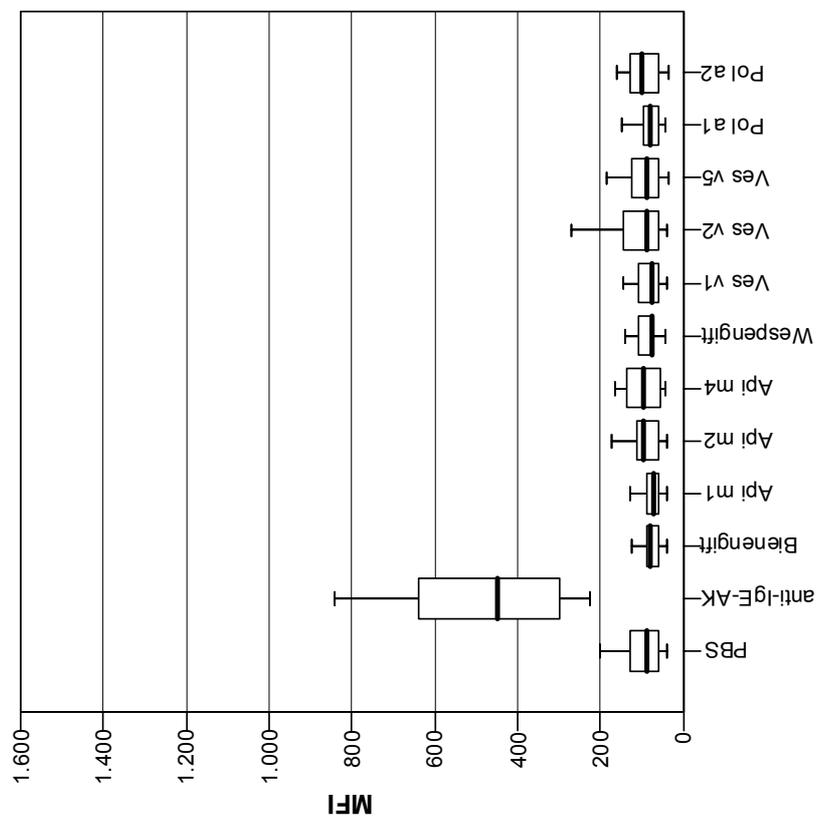
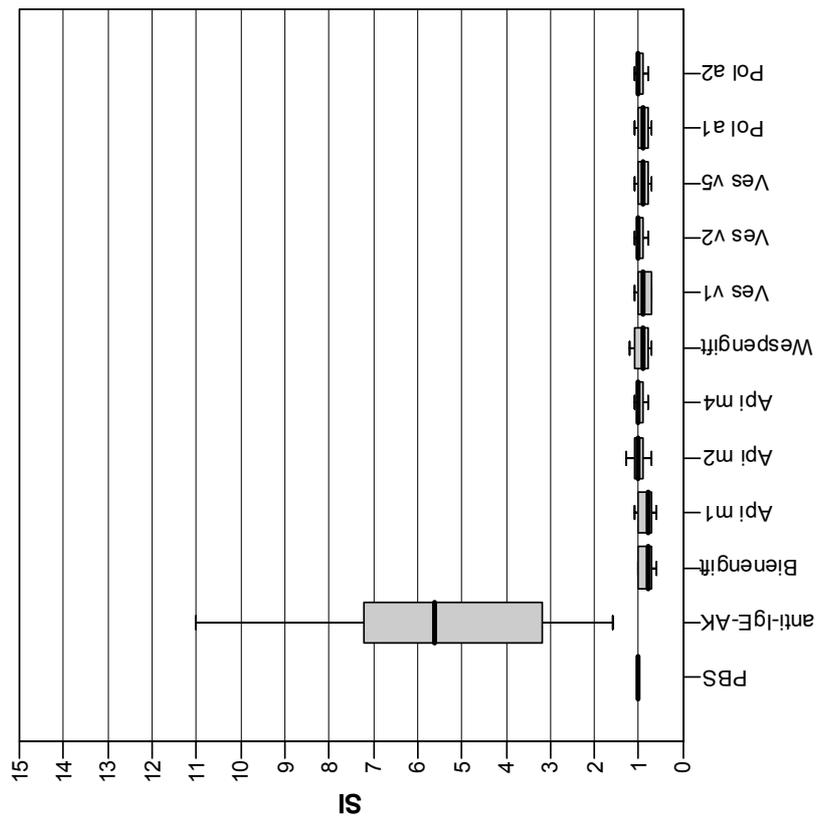
Als Reaktion auf rohes Wespengift ergaben sich mediane Fluoreszenzintensitäten von 45,7 bis 140,1 (MW 90,7 ± SD 33,9; Median 74,3). Die Stimulationsindices nahmen Werte von 0,7 bis 1,2 (MW 0,9 ± SD 0,2; Median 0,9) an. Eine positive Reaktion auf rohes Wespengift (SI>1,3) konnte demnach für keinen dieser Patienten gezeigt werden. Die CD203c-Expression nach Stimulation mit rohem Wespengift unterschied sich nicht signifikant von der CD203c-Expression nach Stimulation mit PBS (Tabelle 10 und Abbildung 13).

Mit Ausnahme der Kontrollperson Nr. 9, die eine positive Reaktion auf Ves v2 und Ves v5 aufwies, ließ sich bei keiner weiteren Kontrolle eine positive Reaktionen auf ein definiertes Insektengiftprotein nachweisen. Alle Kontrollpersonen reagierten positiv auf Anti-IgE-Antikörper. Es handelte sich bei ihnen also nicht um Nonresponder.

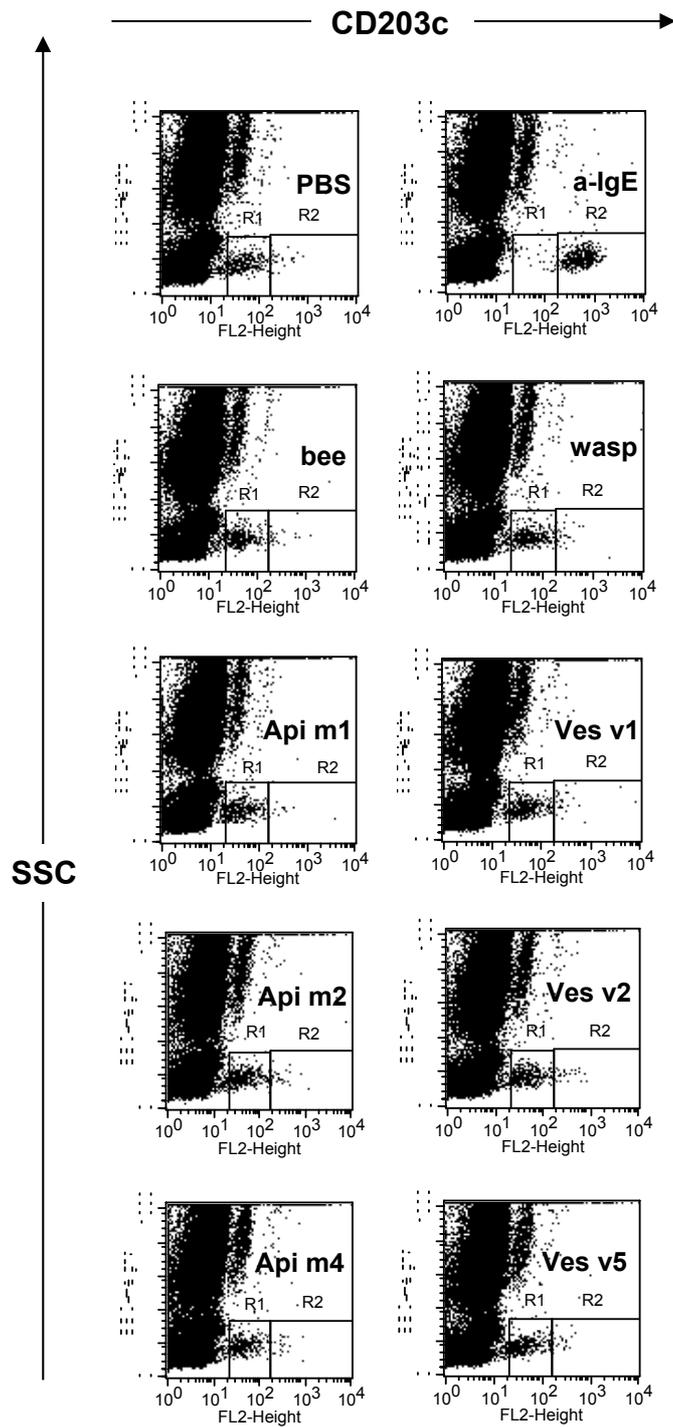
Die Punktwolkendiagramme in Abbildung 14 zeigen die CD203c-Expression der mononukleären Zellen einer Kontrollperson nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Die Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper (Positivkontrolle) führte zur Zunahme der CD203c-Expression, nicht jedoch die Stimulation mit den rohen Insektengiften oder den einzelnen Giftkomponenten.

**Tabelle 10: Kontrollpersonen: Mediane Fluoreszenzintensität MFI / Stimulationsindex SI der 97A6-positiven Zellen nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Allergenen.** Als Maß der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper bzw. den verschiedenen Allergenen wurde die Mediane Fluoreszenzintensität MFI der 97A6-positiven Zellen bestimmt. Zuvor war eine Markierung mit CD203c-spezifischem Antikörper 97A6-PE erfolgt. Der Stimulationsindex errechnete sich wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt. Abkürzungen der Allergene: Rohes Bienengift (B), rohes Wespengift (W). Bienengiftproteine: Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1), Hyaluronidase (Api m2), Melittin (Api m4). Wespengiftproteine: Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1), Hyaluronidase (Ves v2), Antigen 5 (Ves v5). Papierswespen giftkomponenten: Phospholipase (Pol a1), Hyaluronidase (Pol a2).

| Kontr. Nr. | Mediane Fluoreszenzintensität MFI nach Stimulation mit |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|            | PBS  | a-IgE       | B           | Api m1      | Api m2      | Api m4      | W           | Ves v1      | Ves v2      | Ves v5      | Pol a1      | Pol a2      |
| 1          | 128,6 / 1  | 417,9 / 3,2 | 79,9 / 0,6  | 73,7 / 0,6  | 103,7 / 0,8 | 110,4 / 0,9 | 108,4 / 0,8 | 118,6 / 0,9 | 98,2 / 0,8  | 100,9 / 0,8 | 97,3 / 0,8  | 109,9 / 0,9 |
| 2          | 53,8 / 1   | 299,6 / 5,6 | 52,8 / 1    | 58 / 1,1    | 58 / 1,1    | 56,23 / 1   | 59,4 / 1,1  | 61 / 1,1    | 56,7 / 1,1  | 57 / 1,1    | 61 / 1,1    | 53,1 / 1    |
| 3          | 40,7 / 1   | 449,1 / 11  | 40 / 1      | 39,2 / 1    | 38,9 / 1    | 41,98 / 1   | 45,7 / 1,1  | 41,4 / 1    | 41,1 / 1    | 35,6 / 0,9  | 42 / 1      | 36,9 / 0,9  |
| 4          | 89,8 / 1   | 637,8 / 7,1 | 88,6 / 1    | 85,1 / 0,9  | 97,3 / 1,1  | 96,9 / 1,1  | 73,7 / 0,8  | 89 / 1      | 89,8 / 1    | 87,4 / 1    | 90,6 / 1    | 98,7 / 1,1  |
| 5          | 155,4 / 1  | 241,4 / 1,6 | 115,5 / 0,7 | 107,5 / 0,7 | 112,4 / 0,7 | 151,3 / 1   | 138,4 / 0,9 | 107,5 / 0,7 | 146,6 / 0,9 | 123 / 0,8   | 124,1 / 0,8 | 140,1 / 0,9 |
| 6          | 89 / 1   | 640,7 / 7,2 | 71,1 / 0,8  | 71,1 / 0,8  | 88,2 / 1    | 93,1 / 1    | 74,3 / 0,8  | 72,3 / 0,8  | 78,8 / 0,9  | 78,8 / 0,9  | 75,7 / 0,9  | 88,2 / 1    |
| 7          | 200,8 / 1  | 580,3 / 2,9 | 124,1 / 0,6 | 129,2 / 0,6 | 173,1 / 0,9 | 165,5 / 0,8 | 140,1 / 0,7 | 143,3 / 0,7 | 172,3 / 0,9 | 143,3 / 0,7 | 147,2 / 0,7 | 162,5 / 0,8 |
| 8          | 58,8 / 1   | 227,7 / 3,9 | 58,6 / 1    | 58,3 / 1    | 58,6 / 1    | 51,9 / 0,9  | 71,1 / 1,2  | 58,3 / 1    | 58,8 / 1    | 58,3 / 1    | 59,9 / 1    | 59,1 / 1    |
| 9          | 111,4 / 1  | 842,9 / 7,6 | 85,1 / 0,8  | 88,2 / 0,8  | 139,5 / 1,3 | 135,8 / 1,2 | 105,5 / 0,9 | 77,7 / 0,7  | 271,4 / 2,4 | 185,2 / 1,7 | 81,3 / 0,7  | 126,9 / 1,1 |



**Abbildung 13:** Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (links) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (rechts) bei den 9 Kontrollpersonen nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den verschiedenen Allergenen. Für jedes Stimulans sind der Median der MFI (fette, horizontale Linie), das Wertintervall von der 25%- bis zur 75%-Perzentile (weiß bzw. grau hinterlegter Kasten) und das Minimum und Maximum dargestellt.



**Abbildung 14: Hochregulierung der CD203c-Expression auf den basophilen Granulozyten einer Kontrollperson.** Im Gegensatz zu den Allergikern ließ sich bei der Kontrollperson eine Erhöhung der CD203c-Expression nur nach Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper nachweisen. Die Stimulation der Basophilen und Evaluation der CD203c-Expression wurden durchgeführt wie in Abbildung 6 beschrieben.

### *Vergleich der Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen und der Standarddiagnostik*

Bei allen 5 untersuchten Bienengiftallergikern, 23 von 27 Wespengiftallergikern und 7 von 9 bienen- und wespengiftallergischen Patienten führten die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen zur gleichen Allergiediagnose, wie die Standarddiagnostik.

Eine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad der allergischen Reaktion (Mueller-Grad) und der Höhe des Stimulationsindex SI für das/ die entsprechende/n Insektengift/e konnte für keine der 3 Allergikergruppen nachgewiesen werden. Auch fand sich in keiner der drei Gruppen ein Zusammenhang zwischen der Höhe der CAP-RAST-Klasse oder den Hauttestergebnissen und der Ausprägung des Stimulationsindex SI.

### **3.2.3 Allergeninduzierte Hochregulierung der CD203c-Expression nach vorhergehender Kultivierung der Basophilen in IL-3-haltigem Medium**

#### *Reaktion der beiden wespengiftallergischen Nonresponder*

*Patientin Nr. 16:* Die Mediane Fluoreszenzintensität MFI aller vier Stimulantien (PBS,  $\alpha$ -IgE-Ak, Bienengiftextrakt, Wespengiftextrakt) wiesen vor IL-3-Inkubation ähnlich hohe Werte auf (zwischen 121,9 und 191,1). Der errechnete Stimulationsindex lag für die verwendeten Stimulantien  $<1,3$ . Somit ließ sich weder für Anti-IgE-Antikörper noch für eines der Insektengifte eine spezifische Hochregulierung der CD203c-Expression nachweisen. Nach einstündiger Kultivierung der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium konnte bei allen vier Stimulationsansätzen eine Vervielfachung der durchschnittlichen CD203c-Expression gegenüber den Ansätzen ohne IL-3-Behandlung beobachtet werden. Der MFI-Wert für Anti-IgE-Antikörper stieg um den Faktor 5,6 auf 1207,9, der für rohes Bienengift um den Faktor 6 auf 1000. Die MFI für Wespengiftextrakt steigerte sich sogar um den 10,4-fachen Wert auf 1263,5. Da jedoch auch die MFI der Negativkontrolle um den Faktor 5,6 auf 1065 gestiegen war, fand

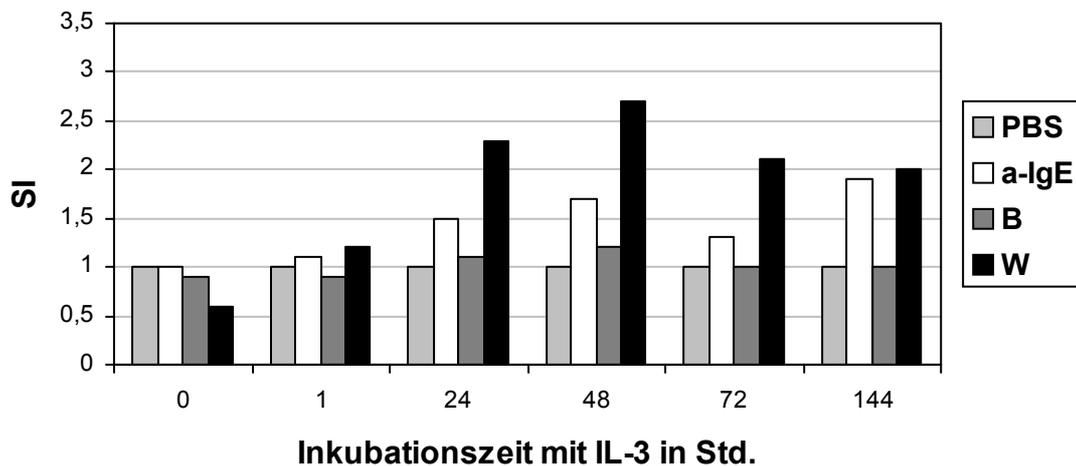
sich auch für die 1-Stunden-Werte keine positive Reaktion ( $SI > 1,3$ ). Für eine IL-3-Vorbehandlung  $\geq 24$  Stunden sanken die MFI der Negativkontrolle und der mit Bienengift stimulierten Probe wieder ab, wohingegen der MFI-Wert für Anti-IgE-Antikörper konstant blieb und sich für Wespengiftextrakt sogar weiter erhöhte. Dadurch stieg der Stimulationsindex für Anti-IgE-Antikörper  $SI_{a-IgE-Ak}$  von ursprünglich 1,0 auf 1,5 nach 24-stündiger, 1,7 nach 48-stündiger und sogar auf 1,9 nach 144-stündiger IL-3-Inkubation. Für Wespengift lag der SI-Wert bei 2,3 nach 24-stündiger IL-3-Inkubation. Ein Wert von 2,7 wurde beobachtet, nachdem die Basophilen zuvor für 48 Stunden mit IL-3 kultiviert worden waren. Für rohes Bienengift ergaben sich für alle untersuchten IL-3-Inkubationszeiten keine wesentlichen Steigerungen der SI-Werte (siehe Tabelle 11 und Abbildung 15).

*Patientin Nr. 33:* Die MFI aller vier Stimulantien waren ohne IL-3-Vorbehandlung vergleichbar und nahmen Werte zwischen 85,8 und 94,3 an. Die Stimulationsindices zeigten weder für Anti-IgE-Antikörper noch für die Insektengifte eine positive Reaktion an. Auch bei dieser Patientin ließ sich nach einstündiger IL-3-Inkubation eine deutliche aber unspezifische Zunahme der durchschnittlichen CD203c-Expression für alle Stimulantien beobachten. Die Stimulationsindices aller vier Stimulantien (PBS, Anti-IgE-Antikörper, Bienengift, Wespengift) lagen bei 1,0. Dagegen ließ sich nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden für rohes Wespengift ein SI-Wert von 2,4 nachweisen. Für Anti-IgE-Antikörper und Bienengiftextrakt war weder für die 24-stündige, noch für eine längere IL-3-Inkubationszeit eine Zunahme des Stimulationsindex zu verzeichnen (siehe Tabelle 11 und Abbildung 16).

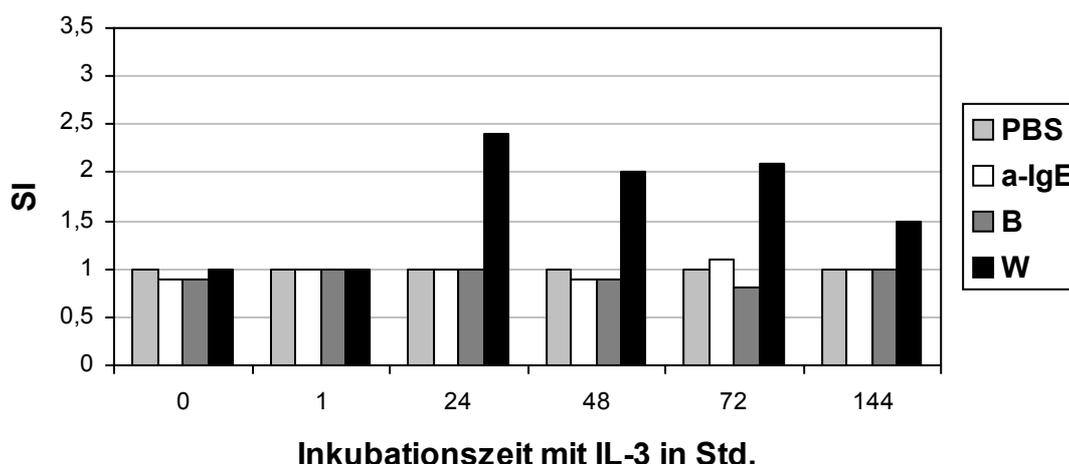
Somit ließ sich für beide wespengiftallergischen Nonresponderinnen nach vorhergehender IL-3-Kultivierung der basophilen Granulozyten für mindestens 24 Stunden eine moderate Zunahme des Stimulationsindex für Wespengiftextrakt nachweisen. Eine Zunahme des Stimulationsindex für Anti-IgE-Antikörper war ausschließlich bei Pat. Nr. 16 zu beobachten.

**Tabelle 11: Mediane Fluoreszenzintensität MFI und Stimulationsindex SI der beiden wespen Giftallergischen Nonresponder vor (0 Std.) und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium (für 1, 24, 48, 72, 144 Std.). Als Stimulantien wurden PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE) sowie rohes Bienen-(B) und Wespengift (W) eingesetzt (Konz. von a-IgE, B, W: 1µg/ml). Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt.**

| Pat. Nr. | Inkubationszeit mit IL-3 (Std.) | MFI / SI nach Stimulation mit |              |             |              |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------|--------------|
|          |                                 | PBS                           | a-IgE        | B           | W            |
| 16       | 0                               | 191,1 / 1                     | 189,4/1      | 165,5 / 0,9 | 121,9 / 0,6  |
|          | 1                               | 1065 / 1                      | 1207,9 / 1,1 | 1000 / 0,9  | 1263,5 / 1,2 |
|          | 24                              | 729,9 / 1                     | 1104 / 1,5   | 827,9 / 1,1 | 1700,1 / 2,3 |
|          | 48                              | 604,3 / 1                     | 1055,5 / 1,7 | 763,5 / 1,2 | 1625,3 / 2,7 |
|          | 72                              | 842,9 / 1                     | 1129,1 / 1,3 | 805,8 / 1   | 1770,3 / 2,1 |
|          | 144                             | 673,2 / 1                     | 1263,5 / 1,9 | 643,6 / 1   | 1345,6 / 2   |
| 33       | 0                               | 94,3 / 1                      | 88,6 / 0,9   | 85,8 / 0,9  | 92,2 / 1     |
|          | 1                               | 290,3 / 1                     | 289 / 1      | 299,6 / 1   | 302,3 / 1    |
|          | 24                              | 445,1 / 1                     | 463,5 / 1    | 457,3 / 1   | 1084,3 / 2,4 |
|          | 48                              | 416,1 / 1                     | 378,6 / 0,9  | 358,7 / 0,9 | 820,5 / 2    |
|          | 72                              | 361,9 / 1                     | 476,1 / 1,1  | 339,8 / 0,8 | 873,8 / 2,1  |
|          | 144                             | 417,9 / 1                     | 429,4 / 1    | 403,2 / 1   | 615,3 / 1,5  |



**Abbildung 15: Stimulationsindex SI eines wespen Giftallergischen Nonresponders (Pat. Nr. 16) vor (0 Std.) und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium (für 1, 24, 48, 72, 144 Std.). Die Stimulation erfolgte mit PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE), rohem Bienen- (B) und Wespengift (W).**



**Abbildung 16:** *Stimulationsindex SI eines wespengiftallergischen Nonresponders (Pat. Nr. 33) vor (0 Std.) und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium (für 1, 24, 48, 72, 144 Std.). Die Stimulation erfolgte mit PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE), rohem Bienen- (B) und Wespengift (W).*

#### *Reaktion eines wespengiftallergischen Responders*

Die basophilen Granulozyten eines wespengiftallergischen Responders (Pat. Nr. 41), wurden ebenfalls in IL-3-haltigem Medium kultiviert. Nach den beschriebenen Inkubationszeiten wurde mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder den beiden rohen Insektengiften stimuliert und die Zellen auf ihre CD203c-Expression untersucht.

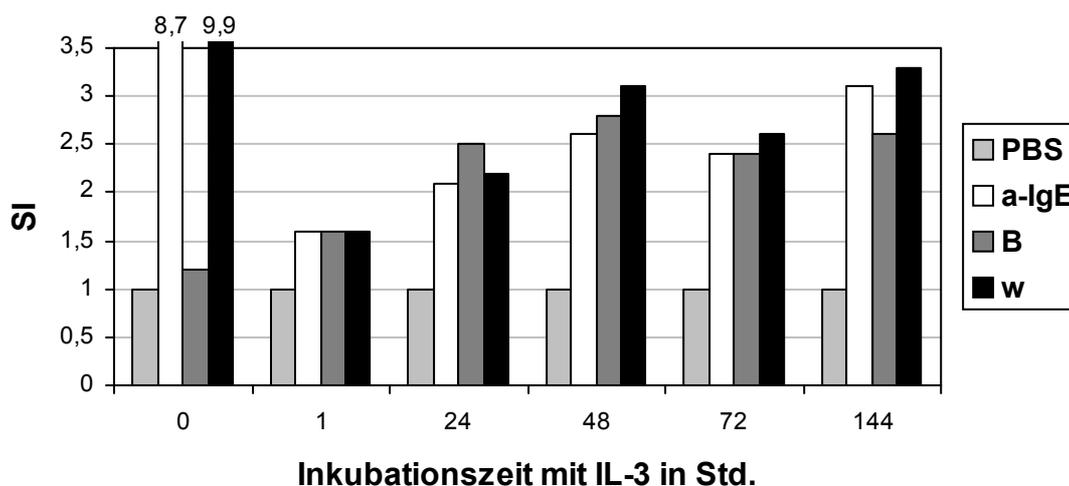
Nach einstündiger Vorbehandlung der Zellen mit IL-3 trat für alle 4 Stimulantien eine Zunahme der CD203c-Expression gegenüber den nicht vorbehandelten Basophilen auf. Die Steigerungsraten der MFI für PBS, Anti-IgE-Antikörper, Bienen- und Wespengift unterschieden sich deutlich voneinander. Für PBS stieg die MFI von 103,2 auf 763,5 (7,4-fache Steigerung). Dagegen führte die Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper nur zu einem Anstieg der MFI um den Faktor 1,4. Die MFI hatte ohne IL-3-Inkubation 897,7 betragen und stieg auf 1229,8. Ein relativer Zuwachs der MFI um den Faktor 1,2 von anfänglich 1018,2 auf 1252,2 trat für die Stimulation mit Wespengift auf. Interessanterweise ließ sich für rohes Bienengift eine starke Zunahme der MFI von 122,4 ohne vorherige IL-3-Behandlung auf 1218,8 nach einstündiger Vorbehandlung nachweisen. Während die MFI der Negativkontrolle für Inkubationszeiten  $\geq 24$  Stunden wieder

sank, blieben die 1-Stunden-Werte für Anti-IgE-Antikörper und Wespengiftextrakt in etwa konstant. Bemerkenswerterweise war dies auch für Bienengiftextrakt der Fall.

Für die Werte des Stimulationsindex bedeuteten die beschriebenen Änderungen der durchschnittlichen CD203c-Expression folgendes: Der Stimulationsindex für Anti-IgE-Antikörper sank vom 8,7 (ohne IL-3-Behandlung) auf 1,6 (IL-3-Kultivierung der Zellen für 1 Stunde). Für längere Inkubationszeiten stieg der  $SI_{a-IgE-Ak}$  wieder an und lag bei einer Inkubationszeit von 144 Stunden bei 3,1. Ähnlich verhielt sich der SI für Wespengift. Der Stimulationsindex für Bienengift stieg interessanterweise von 1,2 (ohne IL-3-Vorbehandlung) auf Werte von 1,6 (IL-3-Kultivierung für 1 Std.), 2,5 (IL-3-Kultivierung für 24 Std.) sowie maximal 2,8 (IL-3-Kultivierung für 48 Std.) an (siehe Tabelle 12 und Abbildung 17).

**Tabelle 12: Mediane Fluoreszenzintensität MFI und Stimulationsindex SI eines wespengiftallergischen Responders vor und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium. Die Stimulation erfolgte mit PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE), rohem Bienen- (B) und Wespengift (W). Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt.**

| Pat. Nr. | Inkubationszeit mit IL-3 (Std.) | MFI / SI nach Stimulation mit |              |              |              |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|          |                                 | PBS                           | a-IgE        | B            | W            |
| 41       | 0                               | 103,2 / 1                     | 897,7 / 8,7  | 122,4 / 1,2  | 1018,2 / 9,9 |
|          | 1                               | 763,5 / 1                     | 1229,8 / 1,6 | 1218,8 / 1,6 | 1252,2 / 1,6 |
|          | 24                              | 559,8 / 1                     | 1202,5 / 2,1 | 1370 / 2,5   | 1252,2 / 2,2 |
|          | 48                              | 459,3 / 1                     | 1181 / 2,6   | 1298 / 2,8   | 1420,2 / 3,1 |
|          | 72                              | 537,6 / 1                     | 1286,4 / 2,4 | 1309,8 / 2,4 | 1407,5 / 2,6 |
|          | 144                             | 378,6 / 1                     | 1154,8 / 3,1 | 1252,2 / 2,6 | 1240,9 / 3,3 |



**Abbildung 17:** Stimationsindex *SI* eines wespengiftallergischen Responders (Pat. Nr. 41) vor (0 Std.) und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium (für 1, 24, 48, 72, 144 Std.). Zur Stimulation der Basophilen wurden PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE) sowie rohes Bienen-(B) und Wespengift (W) eingesetzt.

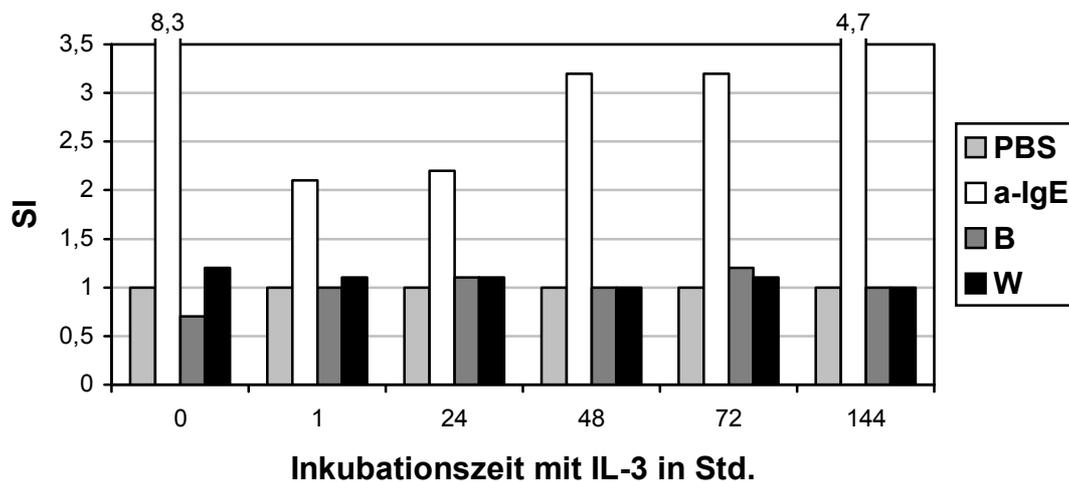
#### Reaktion der Kontrollpersonen

Bei beiden Kontrollpersonen nahm die CD203c-Expression der Basophilen nach IL-3-Vorbehandlung der Zellen für alle vier Stimulantien zu. Für PBS und die beiden Insektengifte war die prozentuale Zunahme der MFI vergleichbar (12- bis 18,8-fache Steigerung bei Kontrolle 3 und 14,2- bis 19,8-fache Steigerung bei Kontrolle 4). Die Maxima wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erreicht. Der relative Zuwachs der MFI für PBS und die beiden Insektengifte fiel deutlich höher aus als für Anti-IgE-Antikörper (hierunter nur 3,3-facher Anstieg der MFI für Kontrolle 3 und 4,2-facher Anstieg für Kontrolle 4 nach 24-stündiger IL-3-Inkubation). Für Kulturzeiten >24 Stunden nahm die Stimulierbarkeit der Basophilen durch PBS, Bienen- und Wespengift wieder ab, nicht jedoch für Anti-IgE-Antikörper.

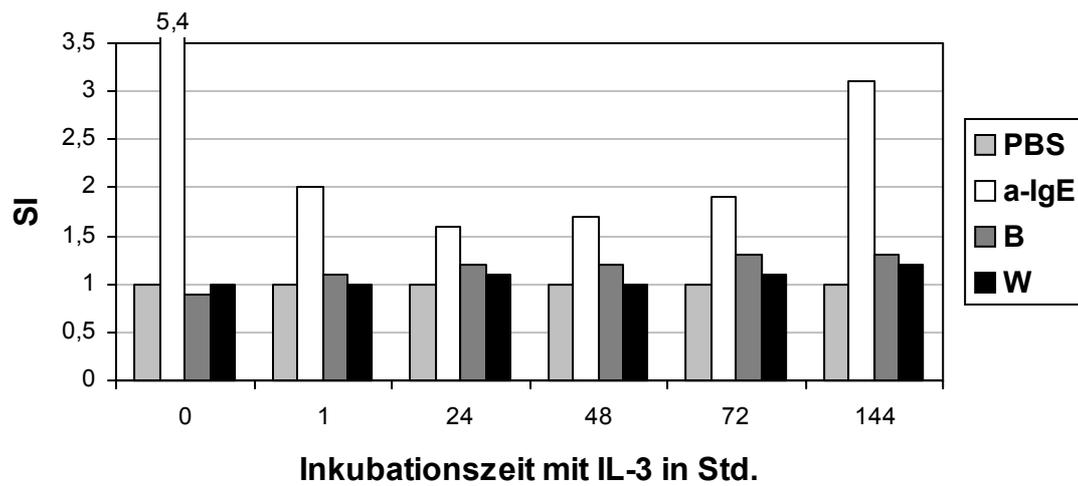
Der Stimationsindex für Anti-IgE-Antikörper sank für Kontrolle 3 von 8,3, für Kontrolle 4 von 5,4 (ohne IL-3-Behandlung) auf Werte von 2,2 bzw. 1,6 bei vorheriger IL-3-Kultivierung der Zellen für 24 Stunden. Für längere Kulturzeiten stiegen der  $SI_{a-IgE-Ak}$  wieder an. Keine wesentlichen Veränderungen des *SI* trotz IL-3-Kultivierung traten bei den Kontrollpersonen nach Stimulation mit Bienen- oder Wespengift auf (siehe Tabelle 13 sowie Abbildung 18 und 19).

**Tabelle 13: Mediane Fluoreszenzintensität MFI und Stimulationsindex SI zweier Kontrollpersonen vor und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium.** Die Stimulation erfolgte mit PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE), rohem Bienen- (B) und Wespengift (W). Positive Reaktionen (SI-Wert >1,3) sind in der Tabelle grau hinterlegt.

| Kont. Nr. | Inkubationszeit mit IL-3 (Std.) | MFI / SI nach Stimulation mit |              |             |             |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------|-------------|
|           |                                 | PBS                           | a-IgE        | B           | W           |
| 3         | 0                               | 40 / 1                        | 330,8 / 8,3  | 29,4 / 0,7  | 46,6 / 1,2  |
|           | 1                               | 160,4 / 1                     | 333,8 / 2,1  | 167 / 1     | 171,5 / 1,1 |
|           | 24                              | 500,3 / 1                     | 1104 / 2,2   | 552,3 / 1,1 | 562,3 / 1,1 |
|           | 48                              | 358,7 / 1                     | 1134,2 / 3,2 | 352,8 / 1   | 342,9 / 1   |
|           | 72                              | 330,8 / 1                     | 1074,6 / 3,2 | 399,5 / 1,2 | 366,8 / 1,1 |
|           | 144                             | 226,7 / 1                     | 1065 / 4,7   | 228,8 / 1   | 230,8 / 1   |
| 4         | 0                               | 50,5 / 1                      | 271,4 / 5,4  | 44,5 / 0,9  | 50 / 1      |
|           | 1                               | 170 / 1                       | 346 / 2      | 181,1 / 1,1 | 174,7 / 1   |
|           | 24                              | 716,9 / 1                     | 1134,2 / 1,6 | 881,7 / 1,2 | 820,5 / 1,1 |
|           | 48                              | 509,4 / 1                     | 850,5 / 1,7  | 593,5 / 1,2 | 509,4 / 1   |
|           | 72                              | 461,4 / 1                     | 889,7 / 1,9  | 577,7 / 1,3 | 495,8 / 1,1 |
|           | 144                             | 226,7 / 1                     | 704,1 / 3,1  | 283,9 / 1,3 | 269 / 1,2   |



**Abbildung 18: Stimulationsindex SI einer Kontrollperson (Nr. 3) vor (0 Std.) und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium (für 1, 24, 48, 72, 144 Std.).** Zur Stimulation der Basophilen wurden PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE) sowie rohes Bienen-(B) und Wespengift (W) eingesetzt.



**Abbildung 19:** *Stimulationsindex SI von Kontrollperson Nr. 4 vor (0 Std.) und nach Inkubation der basophilen Granulozyten in IL-3-haltigem Medium (für 1, 24, 48, 72, 144 Std.). Zur Stimulation der Basophilen wurden PBS, Anti-IgE-Antikörper (a-IgE) sowie rohes Bienen-(B) und Wespengift (W) eingesetzt.*

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diagnostische Möglichkeiten bei Insektengiftallergien**

#### **4.1.1 Standarddiagnostik**

Die Erhebung der Stichanamnese mit Beurteilung der geschilderten körperlichen Beschwerden, intrakutane Hauttests und die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen die Insektengifte im Patientenserum gelten als Standardmaßnahmen zur Sicherung einer Insektengiftallergie [94, 110] und wurden auch in dieser Studie durchgeführt.

Dennoch sind diese diagnostischen Mittel mit einigen Problemen behaftet, die die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen erschweren und nicht selten zu widersprüchlichen Resultaten führen [37, 141]. Dies war auch bei einigen der hier untersuchten 42 Patienten der Fall (Pat. Nr. 10, 13, 31, 38, 41).

So hängen anamnestische Daten wesentlich von der Mitarbeit des Patienten, der Qualität der Befragung und Erfahrung des Untersuchers ab. Einheitliche Anamnesebögen existieren nicht, ebenso wenig wie einheitlichen Kriterien zur Festlegung des klinischen Schweregrades einer allergischen Reaktion.

Serologische Untersuchungen lassen keine direkten Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Insektengiftallergie zu, da in der Allgemeinbevölkerung ein nicht unerheblicher Anteil seropositiver, jedoch nicht allergischer Individuen vorkommt [94, 106, 110, 140]. Bei negativer Serologie muss die Möglichkeit falschnegativer Testergebnisse in Betracht gezogen werden. Beim Vergleich serologischer Ergebnisse verschiedener Studien kommt erschwerend hinzu, dass verschiedene serologische Testsysteme zum Einsatz kommen, die sich in ihrer Spezifität und Sensitivität unterscheiden können.

Eine größere Sicherheit bezüglich der Bestätigung einer Insektengiftallergie bieten Hauttests. Allerdings zeigt sich im Falle von Hauttestungen eine weitere

Problematik, insbesondere dann, wenn nicht nur Prick-Tests, sondern intrakutane Injektionen der Insektengifte vorgenommen werden. Der Hauttest stellt eine Reexposition des Patienten gegenüber jenem Stoff dar, auf den er anamnestisch mit allergischen Symptomen reagiert hat. Im Zuge dieser diagnostischen Reexposition kann es zu einer erneuten allergischen Reaktion kommen, die auch den Schweregrad eines anaphylaktischen Schocks erreichen kann [19, 22]. Hauttests stellen also eine potentielle Gefahr für den Patienten dar. Aus diesem Grund dürfen Intrakutantests nur in Notfallbereitschaft durchgeführt werden, was in der Regel eine stationäre Aufnahme des Patienten notwendig macht. Dies verursacht nicht unerhebliche Kosten.

#### **4.1.2 Effektorzell-basierte In-vitro-Diagnostik**

Aufgrund oben genannter Probleme in der Diagnostik von Insektengiftallergien gibt es seit längerer Zeit Bemühungen, objektive, reproduzierbare In-vitro-Allergietests zu entwickeln. Dabei sind bisher überwiegend 2 Strategien zur Verifizierung allergischer Reaktionen verfolgt worden: (1) Messung von Mediatoren wie Histamin [21, 85, 137], Tryptase [87, 113] oder Leukotrien-C4 [88, 114], die während einer allergischen Reaktion aus basophilen Granulozyten oder Mastzellen freigesetzt werden. (2) Quantifizierung von Aktivierungsmarkern, die nach allergischer Reaktion auf der Zelloberfläche basophiler Granulozyten verstärkt exprimiert werden [2, 31, 32, 116, 123]. Letzteres geschieht mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden [115]. In der Vergangenheit beruhten mehrere Studien auf der Bestimmung der allergeninduzierten Hochregulation des Basophilenmarkers CD63 [26, 75, 88, 89, 105].

Neuere Untersuchungen identifizierten das Oberflächenantigen CD203c als geeigneteren Aktivierungsmarker basophiler Granulozyten im Rahmen allergischer Reaktionen [41, 109]. CD203c kommt im Gegensatz zu CD63 im peripheren Blut ausschließlich auf basophilen Granulozyten vor [11, 12]. Daher reicht eine Einfachmarkierung mit Anti-CD203c-Antikörper zur zweifelsfreien Identifizierung aktivierter Basophiler aus. Dies ist für CD63 nicht der Fall [9]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte für 22 Insektengiftallergiker gezeigt werden, dass die Stimulation basophiler Granulozyten mit Wespen- oder Bienen-

giftextrakten zu einer signifikanten und spezifischen Zunahme der CD203c-Expression führt [109].

In dieser Studie wurde der kürzlich beschriebene Stimulationsassay [109] von ursprünglich 70 auf 45 Minuten reduziert, um die Einsatzfähigkeit in der klinischen Routine zu verbessern. Als Stimulantien wurde neben den Bienen- und Wespengiftextrakten definierte, allergene Insektengiftmoleküle eingesetzt.

#### **4.1.3 Einsatz rekombinanter oder gereinigter Insektengiftkomponenten**

In der Diagnostik von Typ-I-Reaktionen hat der Einsatz von singulären, definierten Allergenen anstelle von Allergengemischen in den letzten Jahren einen immer größeren Stellenwert bekommen. Zur Gewinnung der einzelnen Allergene ist die Auftrennung eines Allergengemischs in seine Einzelkomponenten möglich, wenn auch aufwendig [73, 84]. Durch die rasche Entwicklung neuer biotechnischer Methoden bietet sich heute das Erzeugen rekombinanter Allergene an. Sie werden nach Klonierung der entsprechenden cDNA in heterologen Systemen wie *E. coli*, Insekten- oder Hefezellen exprimiert und anschließend aufgereinigt [23, 90, 125, 126, 128]. Auf diese Weise lassen sich große Mengen eines hochreinen Allergens kostengünstig herstellen.

Mit Hilfe dieser reinen Allergene besteht die Möglichkeit Grundlagen immunologischer Mechanismen an einzelnen, definierten Molekülen zu untersuchen [8, 131]. Dies betrifft die Klärung der räumlichen Struktur von Allergenen [82, 120], Studien über Allergen-Antikörper-Interaktionen und die Charakterisierung von B- und T-Zell-Epitopen auf Allergenmolekülen [20, 70, 86, 127, 129]. Derartige Untersuchungen haben unter anderem ein besseres Verständnis von Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Allergenen ermöglicht [36, 52, 71, 80]. Andererseits ließen sich neue Allergenkonstrukte für therapeutische Zwecke entwickeln. Solche Moleküle besitzen eine reduzierte Affinität zu IgE-Antikörpern. Ihre T-Zell-Epitope sind jedoch unverändert. Im Rahmen einer Hyposensibilisierungstherapie führt die Interaktion der Allergenkonstrukte mit körpereigenen T-Lymphozyten zur erwünschten Immunmodulation im Sinne einer T-Zell-Anergie [28, 69, 95, 100, 108, 133, 135, 136]. Gleichzeitig besteht bei der Hyposensibili-

sierung ein geringeres Risiko eine IgE-Antikörper-vermittelte allergische Reaktion auszulösen. Derartig veränderte Allergene eignen sich hervorragend für den zukünftigen Einsatz in der Hyposensibilisierungstherapie.

Auch in der klinischen Diagnostik von Typ-I-Allergien finden rekombinante Allergene bereits Anwendung und sind dabei, bisher verwendete Allergenextrakte zu verdrängen. Die Gründe hierfür sind einleuchtend. Allergenzubereitungen sind oftmals komplexe Stoffgemische, die aus Naturstoffen extrahiert werden. Die Zusammensetzung des Extraktes ist stark vom Ausgangsmaterial wie auch von der Art der Allergengewinnung abhängig, so dass die Konzentration der einzelnen Allergene im Endprodukt erheblich schwanken kann. Verunreinigungen stellen ein weiteres Problem von Allergenextrakten dar. Dies beeinflusst die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen und macht es oftmals schwierig, Ergebnisse, die unter Verwendung von Allergenextrakten verschiedener Hersteller gewonnen wurden, miteinander zu vergleichen [99].

Im Falle von Insektengiften sind gut standardisierte Allergenzubereitungen erhältlich [3], was nicht zuletzt auf die überschaubare Anzahl der enthaltenen Allergene und die relativ einfache Giftgewinnung zurückzuführen ist. Trotzdem sind auch hier ständige Kontrollen der Giftzusammensetzung erforderlich, um variable Konzentrationen der Einzelkomponenten zu berücksichtigen [103, 104] und Giftsackverunreinigungen auszuschließen [97]. Insektengifte enthalten Proteasen, die in der Lage sind, die enthaltenen Allergenproteine zu degradieren, was die Haltbarkeit des Allergengemisches beeinträchtigt [27, 84]. Ein weiterer natürlicher Inhaltsstoff des Wespen- und Bienengiftes ist Histamin. Bei Hauttests wurden dadurch nach Injektion höherer Giftkonzentrationen histamininduzierte, falsch-positive Reaktionen beobachtet [7, 34].

Der Einsatz singulärer, rekombinanter oder gereinigter Allergene macht es möglich, für jeden untersuchten Patienten genau jene Allergenmoleküle festzustellen, gegen welche eine Sensibilisierung vorliegt. Es lassen sich individuelle Sensibilisierungsmuster bestimmen [46, 60, 132]. Sie dienen als Grundlage einer auf den einzelnen Patienten zugeschnittenen Hyposensibilisierungstherapie. Eine Exposition des Patienten gegenüber nicht relevanten Substanzen in

Allergenextrakten wird vermieden. Für den zukünftigen Einsatz einer spezifischen Immuntherapie (SIT) mit hypoallergenen Allergenvarianten oder spezifischen T-Zell-Epitopen stellt die vorherige, exakte Bestimmung der individuellen Sensibilisierungsmuster eine wichtige Voraussetzung dar.

Etliche der oben angeführten Punkte betreffen auch In-vitro-Untersuchungen der basophilen Granulozyten, wie den hier durchgeführten CD203c-Test, so dass es sinnvoll erscheint, in Zukunft auch auf diesem Gebiet definierte Allergenmoleküle einzusetzen. Bei der Anwendung rekombinanter Allergene für Hauttests besteht ein theoretisches Risiko, DNA des Expressionssystems oder Endotoxine auf den Patienten zu übertragen [64]. Aus diesem Grund sind rekombinante Allergene für Hauttestungen in Deutschland gegenwärtig noch nicht zugelassen. Dieses Problem tritt bei dem hier eingesetzten In-vitro-Test nicht auf, so dass sein klinischer Einsatz auch vor diesem Hintergrund sinnvoll erscheint. Rekombinante Allergene können zukünftig für verschiedene Verfahren der Allergiediagnostik, also serologische Untersuchungen, Hauttests und Effektorzell-basierte Methoden eingesetzt werden. Dies wird zu einer höheren Korrelation der Ergebnisse verschiedener Testmethoden und zu einer erheblichen Verbesserung der Diagnostik beitragen [17, 43, 44].

#### **4.1.4 Kultivierung von Nonresponder-Basophilen in IL3-haltigem Medium**

Die Menge freigesetzten Histamins aus den basophilen Granulozyten nach IgE-Rezeptor-Quervernetzung weist eine große interindividuelle Variabilität auf [78, 83]. Bei 8 bis 20% der untersuchten Normalbevölkerung, aber auch bei Patienten mit einer Typ-I-Allergie fehlt die Histamin-Freisetzung aus den Basophilen nach Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper gänzlich [57, 76, 101]. Sie wurden als Nonreleaser oder auch Nonresponder klassifiziert. In diesen Fällen findet sich auch keine durch Anti-IgE-Antikörper oder Allergene vermittelte Hochregulation von granulaassoziierten Molekülen wie CD63 und CD203c [109].

Für die In-vitro-Diagnostik allergischer Sofortreaktionen stellen diese Nonresponder ein besonderes Problem dar, da sich bei ihnen die beschriebenen Strategien der Effektorzell-basierten Diagnostik nicht verfolgen lassen.

Als Ursache des Nonresponder-Status ließ sich weder eine zu geringere Oberflächendichte der basophilen Granulozyten an FcεRI-Rezeptoren noch eine strukturelle Veränderung der Rezeptoren nachweisen [76, 101]. Daher wurde angenommen, dass sich der Ort des Defektes in der Signalkaskade befindet, die dem FcεRI-Rezeptor nachgeschaltet ist. Diese Signalkaskade beinhaltet unter anderem eine frühe Aktivierung der Tyrosinkinase Lyn und Sky unmittelbar nach der Quervernetzung der IgE-Rezeptoren durch Anti-IgE-Antikörper oder Allergenmoleküle [5, 65]. Kepley et al. konnten zeigen, dass den basophilen Granulozyten von Nonrespondern die Tyrosinkinase Sky fehlt und daher keine Aktivierung über die FcεRI-Rezeptor-Signalkaskade möglich ist [66]. Eine gleichzeitige Sky-Defizienz der B-Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen fanden sie nicht und vermuteten daher, dass auch die Mastzellen der Nonresponder dieses Enzym in ausreichender Menge exprimieren. Die Autoren erklärten dadurch, warum Nonresponder überhaupt eine Allergie vom Soforttyp entwickeln und positive Reaktionen in Hauttests zeigen können.

Nonresponder-Basophile lassen sich unter entsprechender Behandlung in Responder-Basophile umwandeln. Die Kultivierung dieser Zellen in IL-3-haltigem Medium für 7 Tage führt zu einer verstärkten Expression von Lyn und Sky, die Fähigkeit Histamin-Freizusetzen wird partiell wiederhergestellt [66, 139]. Dieses Vorgehen bietet einen möglichen Ansatz zur Beseitigung der „Nonresponder-Problematik“ im Einsatz von In-vitro-Allergietests. Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt einer IL-3-Vorbehandlung auf die Hochregulierbarkeit von CD203c exemplarisch an den Basophilen zweier Nonresponder untersucht.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse der Studie

### 4.2.1 CD203c-Expression der basophilen Granulozyten vor Allergenstimulation

Die mediane Fluoreszenzintensität  $MFI_{PBS}$  der nicht aktivierten, PBS-behandelten 97A6-positiven Zellen wies innerhalb aller 3 Allergikergruppen und auch innerhalb der Gruppe der Kontrollpersonen eine starke Streuung auf. Dies spricht dafür, dass bereits im nicht aktivierten Zustand große interindividuelle Unterschiede in der CD203c-Expression der basophilen Granulozyten bestehen. Um festzustellen, ob sich eines der vier untersuchten Kollektive in der durchschnittlichen CD203c-Expression von den anderen unterscheidet, wurde für jede Gruppe der geometrische Mittelwert der  $MFI_{PBS}$  ermittelt. Die geometrischen Mittelwerte der vier Gruppen wurden miteinander verglichen. Der Vergleich erbrachte keinen Unterschied in der durchschnittlichen CD203c-Expression der „ruhenden“ Basophilen zwischen den 3 Allergikergruppen und den Kontrollpersonen. Die Höhe der CD203c-Expression der nicht aktivierten basophilen Granulozyten eines Individuums scheint somit individuell und unabhängig vom Allergiestatus und der Art der Allergie zu sein.

### 4.2.2 CD203c-Expression der basophilen Granulozyten nach Allergenstimulation

Die modifizierte Variante unseres kürzlich beschriebenen Stimulationsassays erwies sich als sensitiver und spezifischer Test. Die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen stimmten in der überwiegenden Zahl der Fälle mit denen der Standarddiagnostik überein. Bei 5/5 Bienengiftallergikern, 23/27 Wespengiftallergikern und 7/9 bienen- und wespengiftallergischen Patienten ließ sich nach Stimulation der basophilen Granulozyten mit den herkömmlichen Bienen- und Wespengiftextrakten die Allergiediagnose bestätigen. Im Falle der vier Wespengiftallergiker ohne adäquate Reaktion auf rohes Wespengift handelte es sich um Nonresponder. Sie reagierten eben so wenig auf Anti-IgE-Antikörper oder eines der anderen eingesetzten Allergene. Bei den beiden bienen- und

wespengiftallergischen Patienten, die nur auf Wespengift- nicht aber auf Bienengiftextrakt reagiert hatten, ließ sich die Diagnose unter Berücksichtigung der Testergebnisse der einzelnen Bienengiftproteine bestätigen.

Bei Patientin Nr. 38 war das In-vitro-Testverfahren von besonderem diagnostischem Wert. Bei ihr wies nur die Befragung auf eine schwere Wespengiftallergie (Grad IV nach Mueller) hin, die Hauttests und die Serologie fielen für beide Insektengifte negativ aus. Die In-vitro-Stimulation mit Wespengiftextrakt (und den einzelnen Wespengiftproteinen) führte zu einer Erhöhung der CD203c-Expression der Basophilen und stützte so den Verdacht einer Wespengiftallergie. Bei der Patientin wurde daraufhin eine Hyposensibilisierungstherapie mit Wespengift durchgeführt.

Leider ließ sich kein statistischer Zusammenhang zwischen der Höhe des Stimulationsindex und dem klinischen Schweregrad der allergischen Reaktion (Mueller-Grad) feststellen. Gleiches gilt für die Korrelationsuntersuchungen von Stimulationsindex und serologischen Ergebnissen (CAP-RAST-Klasse) und Stimulationsindex und Hauttestergebnissen. Hierzu muss angemerkt werden, dass die Aussagekraft dieser Ergebnisse, wegen der geringen Fallzahlen in den Gruppen der Bienengiftallergiker und der Bienen- und Wespengiftallergiker, eingeschränkt ist.

Die Stimulation mit definierten Insektengiftallergenen führte, die Nonresponder ausgenommen, bei allen übrigen 37 insektengiftallergischen Patienten zu einer positiven Reaktion auf mindestens eine Giftkomponente. Innerhalb der 3 Allergikergruppen fanden sich hauptsächlich positive Reaktionen auf die Komponente/n des/ der Gifte/s, die gemäß der Allergiediagnose zu erwarten waren. Das heißt die Bienengiftallergiker zeigten eine Hochregulation der CD203c-Expression auf Bienengiftproteine, die Wespengiftallergiker auf die Komponenten des Wespengiftes und die Bienen- und Wespengiftallergiker auf definierte Allergene beider Gifte.

Bei den eingesetzten Bienengiftkomponenten waren am häufigsten positive Reaktionen auf die Bienenhyaluronidase (Api m2), am zweithäufigsten auf die Bienenphospholipase (Api m1) nachzuweisen. Diese Befunde stimmen mit Un-

tersuchungen anderer Autoren überein, die beide Moleküle für Hauptallergene des Bienengiftes halten [74, 124]. Bei den untersuchten Personen fand sich keine einzige positive Reaktion auf Melittin. Dies mag Ausdruck dafür sein, dass diesem Bienengiftpeptid nur eine geringe allergene Potenz zugeschrieben wird [73]. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Melittin-Moleküle bereits von Beginn an keine allergene Wirksamkeit besaßen. Dies könnte am ehesten durch Veränderungen der Molekülstruktur während des Herstellungsprozesses des Melittin erklärt werden. Über 90% der allergenspezifischen IgE-Antikörper richten sich gegen Epitope, die erst durch Faltung der Proteine/ Peptide in eine dreidimensionale Konfiguration entstehen [74]. Daher führt der Verlust der Tertiärstruktur eines Allergenmoleküls meist auch zum Verlust seiner allergenen Wirkung.

Positive Reaktionen auf alle drei verwendeten Wespengiftproteine wurden häufig beobachtet, wobei sich die Anzahl positiver Reaktionen auf die drei Komponenten nur unwesentlich voneinander unterschied. Auch diese Ergebnisse decken sich mit Angaben aus der Literatur. Alle drei Komponenten werden dort als Hauptallergene des Wespengiftes beschrieben [74].

Einen interessanten Befund zeigten drei bienengiftallergische Patienten. Sie wiesen eine positive Reaktion auf Wespenhyaluronidase auf, ohne dass eine Sensibilisierung gegenüber rohem Wespengift nachweisbar war. Für diese drei Patienten ließ sich gleichzeitig eine positive Reaktion auf die homologe Bienenhyaluronidase (Api m2) verzeichnen. Entsprechend fanden sich unter den Wespengiftallergikern drei Patienten, die neben einer Erhöhung der CD203c-Expression auf die Wespenhyaluronidase (Ves v2) eine positive Reaktion auf die Bienenhyaluronidase (Api m2) zeigten. Auch hier war die Reaktion auf rohes Bienengift negativ ausgefallen. Diese Beobachtungen deuten auf eine Kreuzsensibilisierung der Patienten gegen die Hyaluronidasen der Biene und der Wespe hin. Bei den beiden Hyaluronidasen handelt es sich um die einzigen homologen Allergene der beiden Insektengifte. Sie weisen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von etwa 55% auf (vgl. Kap. 1.2.3). Aus diesem Grund wurden diese Ergebnisse als Kreuzreaktionen Hyaluronidase-spezifischer IgE-Antikörper gewertet [111, 112, 138].

Für die in dieser Arbeit mituntersuchten Allergene der Papierwespe Phospholipase A<sub>1</sub> (Pol a1) und Hyaluronidase (Pol a2) besteht eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zu den homologen Proteinen der Wespe (*Vespula vulgaris*) von etwa 55% bzw. 70%. Unter den 27 Wespengiftallergikern fanden sich 3 Patienten, die positiv auf Pol a1 und vier weitere, die auf Pol a2 reagierten. Bei den 9 Bienen- und Wespengiftallergikern waren zwei weitere positive Reaktionen auf die Hyaluronidase der Papierwespe Pol a2 zu verzeichnen. King et al. berichteten über den Nachweis kreuzreagierender Antikörper für diese Proteine [74]. Aufgrund dieser Beobachtungen und der geringen Verbreitung der Papierwespe in unseren Breiten, ist auch in diesen Fällen eher von kreuzreagierenden Antikörpern gegen homologe Allergenmoleküle, als von einer doppelten Sensibilisierung durch Stiche beider Insektenarten auszugehen.

Platz et al. demonstrierten, dass die Hochregulierbarkeit der CD203c-Expression bei allergischen Patienten von der Dosis des eingesetzten Allergens abhängig ist. Unterhalb einer Konzentration von 10<sup>-1</sup> µg/ml ist hiernach nicht mit einer Zunahme von CD203c zu rechnen [109]. Diese Beobachtung könnte der Grund dafür sein, dass sich Kreuzreaktionen durch den Einsatz reiner und daher höher konzentrierter Einzelkomponenten erkennen lassen, wohingegen sie nach Stimulation mit einem Insektengiftgemisch, das die einzelnen Giftbestandteile in niedrigeren Konzentrationen enthält, verborgen bleiben.

#### **4.2.3 Allergeninduzierte Hochregulierung der CD203c-Expression nach vorhergehender Kultivierung der Basophilen in IL-3-haltigem Medium**

In dieser Arbeit wurde der Effekt von IL-3 auf die CD203c-Expression basophiler Granulozyten zweier wespengiftallergischer Nonresponder untersucht. Zum Vergleich wurden die Basophilen eines wespengiftallergischen Responders und zweier Kontrollpersonen der Inkubation mit IL-3 unterzogen und auf ihre CD203c-Expression untersucht.

Verschiedene Studien zur Wirkung von IL-3 auf basophile Granulozyten zeigten eine erhöhte Aktivierbarkeit dieser Zellen auf diverse Stimuli (α-IgE-Ak, Kom-

plement C5a und C3a, PAF, u.a.) und eine gesteigerte Histamin-Freisetzung und Leukotrien-Produktion nach „IL-3-Priming“ [6, 47, 81, 102, 130]. Unsere Daten zur Wirkung von IL-3 auf die CD203c-Expression demonstrieren, dass IL-3 selbst in der Lage zu sein scheint, eine von zusätzlichen Stimuli (wie Anti-IgE-Antikörper/ Allergen) unabhängige Hochregulation des Oberflächenmarkers CD203c auf Basophilen zu bewirken. Dies konnte bei alle untersuchten Individuen festgestellt werden. Die IL-3-induzierte Erhöhung der CD203c-Expression war bei Respondern in der Lage, spezifische, Anti-IgE-Antikörper-/ Allergen-induzierte Effekte zu überdecken. Dieser Effekt wurde vor allem für die kurze IL-3-Inkubationszeit von einer Stunde beobachtet. Für Responder bedeutet dies zunächst einen Abfall des Stimulationsindex für spezifische Stimuli. Für längere Inkubationszeiten ( $\geq 24$  Std.) trat die unspezifische CD203c-Erhöhung wieder in den Hintergrund, die Stimulationsindices für spezifische Stimuli stiegen bei den Respondern erneut an. Für beide wespengiftallergischen Nonresponder wurde nach Inkubation der Basophilen mit IL-3 für Intervalle  $\geq 24$  Stunden eine wespengiftspezifische Hochregulation von CD203c gesehen. Bei einem Nonresponder registrierten wir nach IL-3-Vorbehandlung zusätzlich eine positive Reaktion ( $SI > 1,3$ ) auf Anti-IgE-Antikörper. In der Literatur fanden sich zwei Arbeiten, die nachwiesen, dass die Inkubation von Nonresponder-Basophilen in IL-3-haltigem Medium die Fähigkeit der Zellen zur Histamin-Freisetzung partiell wiederherstellt [66, 140]. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass IL-3 bei Nonresponder-Basophilen auch die allergenspezifische Hochregulierung von CD203c wiederherzustellen vermag. Bei nachgewiesenem direktem Zusammenhang der Histamin-Freisetzung aus Basophilen und der CD203c-Hochregulation auf ihrer Zelloberfläche [109] sind diese Beobachtungen einleuchtend. Interessanterweise zeigten die Basophilen des wespengiftallergischen Responders nach IL-3-Behandlung auch eine positive Reaktion auf Bienengift ( $SI > 1,3$ ). Vor IL-3-Inkubation war keine Reaktion auf Bienengiftextrakt, wohl aber auf das Bienengiftprotein Hyaluronidase (Api m2) nachweisbar gewesen.

Möglicherweise senkt eine IL-3-Vorbehandlung die oben erwähnte Schwellenkonzentration eines Allergens, welche erreicht werden muss, um eine signifi-

kante Erhöhung der CD203c-Expression auszulösen. Dies würde erklären, warum nach IL-3-Inkubation auch das Bienengiftgemisch mit seiner relativ niedrigen Konzentration an Bienenhyaluronidase eine Erhöhung von CD203c bewirken kann.

Aufgrund der geringen Fallzahl ist die Aussagekraft der Daten zu den Nonrespondern eingeschränkt. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen. Dennoch zeigen sie eine mögliche Lösung des „Nonresponder-Problems“ der In-vitro-Allergietests auf. Sollten sich die oben beschriebenen Beobachtungen zukünftig bestätigen, ist folgender Testablauf denkbar: Nach der Blutentnahme werden zwei Blutproben zurückgestellt. Mit Hilfe der ersten Probe wird der schnelle In-vitro-Test durchgeführt. In diesem Schritt können alle Responder erfasst werden. Wird im ersten Schritt entdeckt, dass es sich um einen Nonresponder handelt, so wird die zweite Probe über Nacht mit IL-3 inkubiert und steht am nächsten Tag zur erneuten Analyse zur Verfügung.

Zusammenfassend handelt es sich bei dem beschriebenen Testverfahren um einen einfachen, kostengünstigen und schnellen In-Vitro-Allergietest, der im Gegensatz zu Hauttests keine Gefährdung für den Patienten darstellt.

In der hier durchgeführten Studie war er in der überwiegenden Zahl der Fälle geeignet, die mit Hilfe von Anamnese, RAST und Hauttestungen gestellte Diagnose einer Bienen- und/ oder Wespengiftallergie zu bestätigen. Für Patienten, bei denen Hauttests und RAST eine anamnestische Insektengiftallergie nicht sichern konnten oder widersprüchlich ausfielen, konnte der CD203c-Test wertvolle Zusatzinformationen liefern.

Durch zusätzliche Verwendung definierter, rekombinanter oder gereinigter Bienen- und Wespengiftallergene war eine Allergiediagnostik auf molekularer Ebene möglich. Für jeden untersuchten Patienten ließ sich das individuelle Muster der Sensibilisierung auf einzelne Giftbestandteile bestimmen. Solche Muster können Grundlage einer anschließenden Hyposensibilisierung mit Einzelkomponenten, zukünftig auch mit hypoallergenen Allergenkonstrukten oder T-Zell-Epitopen sein.

Für zwei wespengiftallergische Nonresponder ließ sich eine durch Wespengift induzierbare, spezifische Hochregulation der CD203c-Expression beobachten, nachdem ihre Basophilen zuvor für mindestens 24 Stunden in IL-3-haltigem Medium kultiviert worden waren. Dieses Verfahren scheint eine Möglichkeit darzustellen, auch Nonresponder der In-vitro-Allergiediagnostik zugänglich zu machen.



## 5 Zusammenfassung

*Einleitung:* Der Einsatz definierter Einzelallergene anstelle von Allergenextrakten hat in der Diagnostik von IgE-Antikörper-vermittelten Soforttypallergien zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Gifte der Biene (*Apis mellifera*) und der Wespe (*Vespa vulgaris*) enthalten zahlreiche verschiedene Einzelkomponenten. Eine allergene Wirkung ist vor allem für die hochmolekularen Proteine der Insektengifte bekannt. Um die Sensibilisierung gegenüber definierten Bienen- und Wespengiftallergenen zu untersuchen, wurde in dieser Studie ein kürzlich beschriebener In-vitro-Allergietest verwendet und weiterentwickelt. Er basiert auf der Allergen-induzierten Hochregulierung der CD203c-Expression auf basophilen Granulozyten.

*Patienten und Methoden:* Vollblutproben von 41 Patienten mit Verdacht auf Bienen- und/ oder Wespengiftallergie sowie von 9 Kontrollpersonen wurden mit den gereinigten Bienengiftallergenen Phospholipase A<sub>2</sub> (Api m1), Hyaluronidase (Api m2) und Melittin (Api m4) oder den gereinigten Wespengiftallergenen Phospholipase A<sub>1</sub> (Ves v1), Hyaluronidase (Ves v2) und rekombinantem Antigen 5 (Ves v5) stimuliert. Zusätzlich wurden zwei gereinigte Allergene der Papierwespe sowie herkömmliches Bienen- und Wespengiftextrakt eingesetzt. PBS diente als Negativ-, Anti-IgE-Antikörper als Positivkontrolle. Die CD203c-Expression der basophilen Granulozyten wurde mit Hilfe des fluorochrommarkierten, CD203c-spezifischen Antikörpers 97A6-PE durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse des In-vitro-Allergietests wurden mit jenen der Standarddiagnostik (Evaluation der Anamnese, Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper, Intrakutantests) verglichen. Zusätzlich wurden die Basophilen zweier wespengiftallergischer Nonresponder, vor Allergenstimulation in Interleukin-3-haltigem Medium kultiviert und anschließend auf ihre CD203c-Expression untersucht. Als Kontrollen dienten ein wespengiftallergischer Responder und zwei nichtallergische Kontrollpersonen.

*Ergebnisse:* Mit Hilfe des modifizierten In-vitro-Allergietest ließ sich für 37/41 Patienten die Diagnose der Standardverfahren bestätigen. Unter den Wespengiftallergikern fanden sich 4 Nonresponder, deren Basophile nach Stimulation mit Allergen/ Anti-IgE-Antikörper nicht in der Lage waren, CD203c hochzuregulieren. Durch Verwendung definierter Allergenmoleküle war es möglich, für jeden untersuchten Patienten das individuelle Muster der Sensibilisierung auf einzelne Giftbestandteile zu bestimmen. 28 der 36 untersuchten Patienten mit einer Wespengiftallergie zeigten eine Hochregulierung von CD203c auf Ves v5, 26 dieser Patienten reagierten mit Ves v2, 23 mit Ves v1. Unter den 14 Patienten mit Bienengiftallergie traten 9 positive Reaktionen auf Api m1 und 14 auf Api m2 auf. Keiner dieser Patienten reagierte auf Api m4. Für 3 Bienengiftallergiker und 3 Wespengiftallergiker zeigten sich kreuzreagierende IgE-Antikörper gegen die homologen Hyaluronidasen beider Insektengifte, die unter Einsatz der Insektengiftextrakte verborgen geblieben waren. Kreuzreaktionen traten auch bei einigen wespengiftallergischen Patienten für die Phospholipasen und Hyaluronidasen der Wespe und der Papierwespe auf. Eine mit Hilfe der Standarddiagnostik gestellte Wespengiftallergie konnte bei zwei Nonrespondern im In-vitro-Test nachvollzogen werden, nachdem ihre Basophilen zuvor mit Interleukin-3 behandelt worden waren. Sie hatten vor Inkubation mit IL-3 keine durch Wespengift induzierbare Hochregulation der CD203c-Expression gezeigt.

*Diskussion:* Die durchflusszytometrische Bestimmung der Allergen-induzierten Hochregulierung der CD203c-Expression auf basophilen Granulozyten stellt einen einfachen, schnellen und wenig invasiven In-vitro-Allergietest dar. Mit Hilfe definierter Allergenmoleküle ist es möglich, für jeden untersuchten Patienten das individuelle Sensibilisierungsmuster gegen einzelne Giftbestandteile zu ermitteln. Für Nonresponder-Individuen scheint die vorherige Kultivierung der Basophilen in IL-3-haltigem Medium eine Möglichkeit darzustellen, die spezifische Hochregulierbarkeit von CD203c wiederherzustellen. Mit Hilfe dieses Verfahrens können auch Nonresponder-Patienten dem CD203c-Test zugänglich gemacht werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Einheiten

|           |   |
|-----------|---|
| Ak        | Antikörper  |
| Api m1    | Phospholipase A <sub>2</sub> des Bienengiftes       |
| Api m2    | Hyaluronidase des Bienengiftes                      |
| Api m4    | Melittin  |
| BSA       | Bovine Serum Albumin                                |
| CD        | Cluster of Differentiation                          |
| EDTA      | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid                   |
| E-NPP3    | Ectonucleotid-Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 3  |
| FACS      | Fluorescence Activated Cell Sorter                  |
| FITC      | Fluorescein Isothiocyanate                          |
| FL1, 2, 3 | Fluoreszenz 1, 2, 3                                 |
| FSC       | Forward Scatter                                     |
| Ig        | Immunglobulin                                       |
| kDa       | Kilodalton  |
| kU/l      | Kilounits/ Liter                                    |
| IL        | Interleukin   |
| LT        | Leukotrien  |
| MFI       | Mediane Fluoreszenzintensität                       |
| MoAk      | Monoklonaler Antikörper                             |
| MW        | Mittelwert  |
| PBS       | Phosphate Buffered Saline                           |
| PE        | Phycoerythrin                                       |
| Pol a1    | Phospholipase A <sub>1</sub> des Papierwespengiftes |
| Pol a2    | Hyaluronidase des Papierwespengiftes                |
| RAST      | Radio-Allergo-Sorbent-Test                          |
| SD        | Standardabweichung                                  |

|        |   |
|--------|---|
| SI     | Stimulationsindex                             |
| SSC    | Side Scatter                                  |
| Std.   | Stunden                                       |
| Ves v1 | Phospholipase A <sub>1</sub> des Wespengiftes |
| Ves v2 | Hyaluronidase des Wespengiftes                |
| Ves v5 | Antigen 5                                     |

## 7 Literatur

1. Abrishami MH, Boyd GK, Settupane GA. Prevalence of bee sting allergy in 2010 girl scouts. *Acta Allergol* 1971;**26**:117-120.
2. Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, et al. Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:411-418.
3. American Academy of Allergy AAIA. The use of standardized allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1997;**99**:583-586.
4. Barnard JH. Studies of 400 Hymenoptera sting death in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1973;**52**:259-264.
5. Benhamou M, Ryba NJP, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP. Protein-tyrosine kinase p72sky in high affinity IgE receptor signaling. *J Biol Chem* 1993;**268**:23318-23324.
6. Bischoff SC, de Weck AL, Dahinden CA. Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:6813-6817.
7. Björkander J, Belin L. Diagnostic skin testing in Hymenoptera sensitivity. In: Oehling A, ed. *Advances in Allergology and applied Immunology*. New York: Pergamon Press, 1980: 733.
8. Blaser K, Carballido J, Faith A, Cramer R, Akdis C. Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;**117**:1-10.
9. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, et al. Marked improvement of the basophil activation test by detection CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:259-65.
10. Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Vanek-Krebitz M, Kraft D, Scheiner O. Recombinant allergens; basic and practical considerations. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 1997(91):80-6.
11. Bühring HJ, Seiffert M, Giesert C, et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical with the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood* 2001;**97**:3303-3305.

12. Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999;**94**:2343-2356.
13. Charpin D, Vervloet D, Haddi E, et al. Prevalence of Allergy to Hymenoptera stings. *Allergy Proc* 1990;**11**:29-32.
14. Coombs RRA. The Jack Pepys Lecture. The hypersensitivity reactions - some personal reflections. *Clin Exp Allergy* 1992;**22**:673-680.
15. Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. Clinical aspects of Immunology. Oxford: Blackwell, 1968: 587.
16. Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: From the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;**115**:99-114.
17. Cramer R, Lidholm J, Menz G, Grönlund H, Blaser K. Automated serology with recombinant allergens. A feasibility study. *Adv Exp Med Biol* 1996;**409**:111-116.
18. Crockard AD, Ennis M. Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? *Clin Exp Allergy* 2001;**31**:975-77.
19. Devenney I, Falth-Magnusson K. Skin prick tests may give generalized allergic reactions in infants. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;**85**:457-460.
20. Dhillon M, Roberts C, Nunn T, Kuo M. Mapping human T cell epitopes on phospholipase A2: The major bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992;**90**:42-51.
21. Dietschi R, Wüthrich B, Marti-Wyss S, Cuhat J. Der Basophilen-Degranulationstest (BDT) als Verlaufsparemeter einer Hyposensibilisierung mit Hymenoptereingiften. *Schweiz Med Wochenschr* 1987;**117**:1728-1735.
22. Dreborg S. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy* 1993;**48**:473-475.
23. Dudler T, Chen W, Wang S, et al. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. *Biochem Biophys Acta* 1992;**1165**:201-210.

24. Einarsson R. Components in insect venoms and analytical methods. *Allergologie* 1986;**9/1** Beiheft:24-29.
25. Einarsson R, Karlsson R, Olsson R, Uhlin T, Oehman S. Crossed immunoelectrophoresis and crossed radioimmunoelectrophoresis analysis of "Yellow Jacket" - common wasp (*Vespula* ssp.). *Allergy* 1985;**40**:257-263.
26. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B. CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:607-14.
27. Esch RE. Role of proteases on the stability of allergen extracts. In: Kurth R, ed. Regulatory control and standardization of allergenic extracts. Stuttgart: Gustav Fischer, 1990: 171-179.
28. Ferreira F, Hirtenlehner K, Jilek A, et al. Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v1: Potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J Exp Med* 1996;**183**:599-609.
29. Fischer P, Külzer R. Zur Prävalenz der Insektengiftallergie in Deutschland. *Allergo J.* 1993;**2** Suppl.2.
30. Gädeke R, Helwig H, Otto M, Schindra F, Weineck B. Tödliche Vergiftungskrankheit eines Kindes nach massenhaften Wespenstichen. *Med. Klin.* 1977;**72**:1487-1492.
31. Gane P, Pecquet C, Crespeau H, Lambin P, Leynadier F, Rouger P. Flow cytometric monitoring of allergen induced basophil activation. *Cytometry* 1995;**19**:361-365.
32. Gane P, Pecquet C, Lambin P, Abuaf N, Leynadier F, Rouger P. Flow cytometric evaluation of human basophils. *Cytometry* 1993;**14**:344-348.
33. Gell PGH, Coombs RRA, Lachman R. Clinical aspects of immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.
34. Geogitis JW, Reisman RE. Venom skin tests in insect-allergic and insect nonallergic populations. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**76**:803-807.
35. Ghannadan M, Hauswirth AW, Scherthaner GH, et al. Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;**127**:299-307.
36. Gmachl M, Kreil G. Bee venom Hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:3569-3573.

37. Golden DBK, Addison BI, Freidhoff L, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Marsh DG. Epidemiology of Hymenoptera venom allergy (HVA): Prospective observations. *J Allergy Clin Immunol* 1986;**77**:142.
38. Golden DBK, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Prevalence of Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1982;**69**:124.
39. Habermann E. Bee and Wasp venoms. *Science* 1972;**177**:314-322.
40. Habermann E, Jentsch J. Sequenzanalyse des Mellitins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1967;**348**:37-50.
41. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, et al. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2002;**110**(1):102-109.
42. Haux P, Sawerthal H, Habermann E. Sequenzanalyse des Bienengift-Neurotoxins (Apamin) aus seinen tryptischen und chymotryptischen Spaltstücken. *Z. Physiol. Chem.* 1967;**348**:737-738.
43. Hemmann S, Ismail C, Blaser K, Cramer R. Skin-test reactivity and isotype-specific immune responses to recombinant Asp fe, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy* 1998;**28**:860-867.
44. Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Cramer R. Skin test reactivity to two recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:601-607.
45. Herbert FA, Salkie ML. Sensitivity to Hymenoptera in adult males. *Ann Allergy* 1982;**48**:12-13.
46. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, et al. Microarrayed allergen molecules: Diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002;**16**:414-416.
47. Hirai K, Morita Y, Misaki Y, et al. Modulation of human basophil histamine release by hematopoietic growth factors. *J Immunol* 1988;**141**:3958-3964.
48. Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T, Fujino M, Kitada C. A new mast cell degranulating peptide "Mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem. Pharm. Bull.* 1979;**27**:1942-1944.

49. Hoffman DR. Insect Venom Allergy, Immunology and Immunotherapy. In: Tu ATMD, Inc., ed. Handbook of natural toxins. New York, 1984: 184-224.
50. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom XV: The immunologic basis of vespid venom cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**75**(5):611-3.
51. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom XIII: Isolation and purification of protein components from three species of vespid venoms. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**75**:599-605.
52. Hoffman DR. Allergens in hymenoptera venom. XXV. The amino acid sequence of antigen 5 molecules and and the structural basis for antigenic cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1993;**92**:707-716.
53. Hoffman DR, Shipman WH. Allergens in bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1976;**58**:551-562.
54. Hoffman DR, Wood CL. Allergens in Hymenoptera venom XI. Isolation of protein allergens from vespula maculifrons (yellow jacket) venom. *J Allergy Clin Immunol* 1984;**74**:93-103.
55. Hoigne R. Allgemeinreaktionen auf Insektenstiche. *Schweiz Med Wochenschr* 1965;**95**:1731-1738.
56. Ishay JS, Barr-Nea L, Buimovitch B. Fractionation and purification of wasp venom. In: Oehling, ed. New York: Pergamon Press, 1980: 411-418.
57. Ishizaka T, Soto CS, Ishizaka K. Mechanisms of passive sensitization, III: number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J Immunol* 1973;**111**:500-511.
58. Jentsch J. Bienengift - Zusammensetzung und Wirkung. *Biologie in unserer Zeit* 1978;**8**:75-81.
59. Johansson SGO. IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis. 1988, Lidköping.
60. Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:1266-72.
61. Karlsson R, Einarsson R. Determination of histamine in Hymenoptera venoms. *Allergy* 1982;**37**:29.

62. Karpas AB, Baer H, Hooton ML, Evans R. A high molecular weight allergenic fraction of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1977;**60**:155-162.
63. Kemeny DM, Banks B, Lawrence A, Pearce F. The purification of hyaluronidase from the venom of the honey bee (*Apis mellifera*). *Biochem Int* 1981;**2**:145-151.
64. Kenimer J, Arntzen FC, Lowenstein H, Haustein D, Gefter M. Regulations governing the licensure of recombinant allergens and peptides. *ACI News* 1994;**6**:60-63.
65. Kepley CL, Wilson BW, Oliver JM. Identification of the Fc RI-activated tyrosine kinases Lyn, Sky and Zap-70 in human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 1998;**102**:304-315.
66. Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Sky deficiency in nonreleaser basophils. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:279-284.
67. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, et al. Api m6: a new bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**107**(5):914-920.
68. King TP, Alagon AC, Kuan J, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Immunological studies of yellowjacket venom proteins. *Mol Immunol* 1983;**20**:297-308.
69. King TP, Jim SY, Monsalve RI, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Spangfort MD. Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: Hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5. *J Immunol* 2001;**166**:6057-6065.
70. King TP, Lu G. Hornet venom allergen, Dol m5; its T cell epitopes in mice and its antigenic cross-reactivity with the mammalian testis protein. *J Allergy Clin Immunol* 1997;**99**:630-639.
71. King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian NF, Soldatova LN. Yellow jacket allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996;**98**:588-600.
72. King TP, Sobotka AK, Alagon A, Kochoumian L, Lichtenstein LM. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet and yellow jacket venoms. *Biochemistry* 1978;**17**:5165-5174.
73. King TP, Sobotka AK, Kochoumian L, Lichtenstein LM. Allergens of honey bee venom. *Arch Biochem Biophys* 1976;**172**(2):661-71.

74. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;**123**(2):99-106.
75. Knol EF, Mul FPJ, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;**88**:328-338.
76. Knol EF, Mul FPJ, Kuijpers TW, Verhoeven AJ, Roos D. Intracellular events in anti-IgE nonreleasing human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 1992;**90**:92-103.
77. Kraft D, Ferreira F, Vrtala S, et al. The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;**118**(2-4):171-6.
78. Lichtenstein LM, McGlashan DWJ. The concept of basophil releasability. *J Allergy Clin Immunol* 1986;**77**(291-294).
79. Light W, Reisman RE, Ilea V, Wypych JI, Okazaki T, Arbesman CE. Studies on the antigenicity and allergenicity of phospholipase A2 of bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1976;**58**:322-329.
80. Lu G, Kochoumian L, King TP. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *J Biol Chem* 1995;**270**:4457-4465.
81. MacDonald SM, Schleimer RP, Kagey-Sobotka A, Gillis S, Lichtenstein LM. Recombinant IL-3 induces histamine release from human basophils. *J Immunol* 1989;**142**:3527-3532.
82. Markovi-Housley Z, Schirmer T, Soldatova LN, Mueller UR. A preliminary crystallographic structure of a recombinant bee venom hyaluronidase. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**103**:S170.
83. Marone G, Poto S, Giugliano R, Celestino D, Bonini S. Control mechanisms of human basophil releasability. *J Allergy Clin Immunol* 1986;**78**:974-980.
84. McNairy MM, Gastmeyer J, Pantera B, Hoffman DR. Isolation of paper wasp venom proteases by affinity chromatography. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**105**:S 57.
85. Minkhar M, Giffard G, Lauret MG, et al. Histamino-liberation (ou histamine release HR): Etude du seuil de positivite dans l'allergie aux venins D'hymenopteres. *Allerg Immunol (Paris)* 1996;**28**:313-316.
86. Mirza O, Henriksen A, Ipsen H, et al. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: Complex formation between a Fab fragment of a mono-

- clonal murine IgG antibody and the major antigen from birch pollen Bet v1. *J Immunol* 2000;**165**:331-338.
87. Monasterolo G, Rossi RE. A simple method to evaluate basophil typtase after allergen challenge in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1997;**99**:575-576.
88. Moneret-Vautrin A, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;**82**:33-40.
89. Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clin Exp Immunol* 1999;**115**:393-396.
90. Monsalve RI, Lu G, King TP. Expression of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expr Purif* 1999;**16**:410-416.
91. Moret C, Enzel C, Leclercq M. Un cas d'envenimation mortelle par piqures multiples d'abeilles (*apis mellifera* L.). *Rev. Med. Liege* 1983;**38**:815-822.
92. Mosbech H. Death caused by wasp and bee stings. *Allergy* 1983;**38**:195-200.
93. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966;**3**:331-336.
94. Müller U. Insektengiftallergie. In: Heppt W, Renz H, Röcken M, eds. *Allergologie*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1998: 277-281.
95. Müller U, Akdis C, Fricker M, et al. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1998;**101**:747-754.
96. Müller U, Mosbech H. Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms. *Allergy* 1993;**48 (Suppl. 14)**:37-46.
97. Müller U, Reisman RE, Wypych JI, et al. Comparison of vespid venoms collected by electrostimulation and by venom sac extraction. *J Allergy Clin Immunol* 1981;**68**:254-261.
98. Muller UR. Recombinant Hymenoptera venom allergens. *Allergy* 2002;**57(7)**:570-6.
99. Nielsen NH, Dirksen A, Mosbech H, Launbjerg J, Biering I, Soborg M. Skin prick testing with standardized extracts from three different manu-

- facturers. A comparative randomized study. *Allergol Immunopathol* 1992;**20**:246-248.
100. Nopp A, Hallden G, Lundahl J, et al. Comparison of inflammatory responses to genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v1 and to recombinant Bet v1 wild type in skin chamber fluids collected from birch pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**106**:101-109.
  101. Nygen KL, Gillis S, MacGlashan DWJ. A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking. *J Allergy Clin Immunol* 1990;**85**:1020-1029.
  102. Ochsenberger B, Tassera L, Bifrare D, Rihs S, Dahinden CA. Regulation of cytokine expression and leukotiene formation in human basophils by groth factors, chemokines and chemotactic agonists. *Eur J Immunol* 1999;**29**:11-22.
  103. Owen MD. Relationship between age and hyaluronidase activity in the venom of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Toxicon* 1979;**17**:94-98.
  104. Owen MD, Bridges AR. Aging in the venom glands of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.): Some morphological and chemical observations. *Toxicon* 1976;**14**:1-5.
  105. Paris-Köhler A, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Clin Immunol* 2000;**105**:339-345.
  106. Pastorello EA, Incorvaia C, Pravettoni V, Bonini S, Canonica GV, Ortoloni C. A multicentric study on sensitivity and specificity of a new in vitro test for measurement of IgE antibodies. *Ann Allergy* 1991;**67**:365-370.
  107. Patrizzi R, Müller U, Yman L, Hoigne R. Comparison of skin tests and RAST for the diagnosis of bee sting allergy. *Allergy* 1979;**34**:249-256.
  108. Pauli G, Purohit A, Oster JP, et al. Clinical evaluation of genetically engineered hypoallergenic rBet v1 derivatives. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;**118**:216-217.
  109. Platz IJ, Binder M, Marxer A, Lischka G, Valent P, Bühring HJ. Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. *Arch Allergy Immunol* 2001;**126**:335-342.

110. Przybilla B, Rueff F. Hymenopterengiftallergie. In: Przybilla B, Bergmann K-C, Ring J, eds. *Praktische allergologische Diagnostik*. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 2000: 263-275.
111. Reisman RE, Muller UR, Wypych JI, Lazell MI. Studies of coexisting honeybee and vespid-venom sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1984;**73**(2):246-52.
112. Reisman RE, Wypych JI, Lazell MI. Further studies of patients with both honeybee- and yellow-jacket-venom-specific IgE. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;**82**(2):190-4.
113. Rossi RE, Monasterolo G, Operti D. A comparative study of the tryptase release test and the cellular allergen stimulation test (CAST) in mite sensitive patients. *Clin Exp Allergy* 1998;**28**:752-757.
114. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000;**30**:1166-1171.
115. Sanz ML, Maselli JP, Gamboa PM, Oehling A, Dieguez I, de Weck AL. Flow cytometric basophil activation test: a review. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2002;**12**(3):143-54.
116. Saporta M, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollen. *Allergy* 2001;**56**:442-445.
117. Scheiner O, Kraft D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy* 1995;**50**(5):384-91.
118. Schwartz HJ, Lockey RF, Sheffer AL, Parrino J, Busse WW, Yunginger JW. A multicenter study on skin-test reactivity of human volunteers to venom as compared with whole body Hymenoptera antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1981;**67**:81-85.
119. Schwartz HJ, Sutheimer C, Gauerke MB, Zora JA, Yunginger JW. Venom-specific IgE antibodies in postmortem sera from victims of sudden unexpected death. *J Allergy Clin Immunol* 1984;**73**:189.
120. Scott DL, Otwinowski Z, Gelb MH, Sigler P. Crystal structure of bee venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* 1990;**250**:1563-1566.
121. Settignano GA, Boyd GK. Prevalence of bee sting allergy in 4992 boy scouts. *Acta Allergol* 1970;**25**:286-291.

122. Settipane GA, Newstead G, Boyd GK. Frequency of Hymenoptera allergy in an atopic and normal population. *J Allergy Clin Immunol* 1972;**50**:146-150.
123. Siegmund R, Vogelsang H, Machnik A, Herrmann D. Surface membrane alteration on blood basophils in patients with hymenoptera venom allergy under immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**106**:1190-1195.
124. Sobotka AK, Franklin RM, Adkinson NF, Jr., Valentine M, Baer H, Lichtenstein LM. Allergy to insect stings. II. Phospholipase A: the major allergen in honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1976;**57**(1):29-40.
125. Soldatova LN, Bakst JB, Hoffman DR, Slater JE. Molecular cloning of a new honeybee venom allergen, acid phosphatase. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**105**:S 378.
126. Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;**101**:691-698.
127. Specht C, Kolsch E. The murine (H-2k) T-cell epitopes of bee venom phospholipase A2 lie outside the active site of the enzyme. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;**112**:226-230.
128. Suck R, Weber B, Kahlert H, Hagen S, Cromwell O, Fiebig H. Purification and immunobiochemical characterization of folding variants of the recombinant major wasp allergen Ves v 5 (antigen 5). *Int Arch Allergy Immunol* 2000;**121**(4):284-91.
129. Thorsted PB, Holm J, Koed GK, et al. Structural analysis and mapping of IgE epitopes on vespine venom allergen Ves v5. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**105**:S330.
130. Valent P, Besemer J, Muhm M, Lechner K, Bettelheim P. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:5542-5546.
131. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunological Reviews* 2001;**179**:119-127.
132. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;**29**:896-904.

133. Valenta R, Vrtala S, Focke-Tejkl M, et al. Genetically engineered and synthetic allergen derivatives: Candidates for vaccination against type I allergy. *Biol Chem* 1999;**380**:815-824.
134. Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D. Recombinant allergens. *Allergy* 1998;**53**(6):552-61.
135. van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterstrom O, et al. Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v1: Results obtained from a mix of two recombinant Bet v1 fragments and recombinant Bet v1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:969-977.
136. Vrtala S, Hirtenlehner K, Susani M, et al. Genetic engineering of recombinant hypoallergenic oligomers of the major birch pollen allergen, Bet v1: Candidates for specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;**118**:218-219.
137. Wüthrich B, R. D, Berlinger F, Marti-Wyss S, Cuhat J. Der Basophilen-Degranulationstest in der Diagnostik der Hymenopterenengift-Allergie. *Schweiz Med Wochenschr* 1987;**117**:1333-1341.
138. Wypych JI, Abeyounis CJ, Reisman RE. Analysis of differing patterns of cross-reactivity of honeybee and yellow jacket venom-specific IgE: use of purified venom fractions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;**89**(1):60-6.
139. Yamaguchi M, Hirai K, Ohta K, Suzuki K, Kitani S, Takaishi Tea. Nonreleasing basophils convert into releasing basophils by culturing with IL-3. *J Allergy Clin Immunol* 1996;**97**:1279-1287.
140. Yunginger JW. Diagnostic testing. In: Kaplan AP, ed. *Allergy*. 2nd edn. ed. Philadelphia: Saunders, 1997: 326-333.
141. Zora JA, Swanson MC, Yunginger JW. How common is unrecognized Hymenoptera venom allergy in the general population? *J Allergy Clin Immunol* 1984;**73**:139.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Posterpräsentation auf der 43. Jahrestagung der American Society of Hematology (ASH), 07.12.-11.12.2001, Orlando, Florida, USA.

The Basophil Cell Surface Marker CD203c Is Upregulated by Hymenoptera Venom in Sensitized Individuals. Binder M, Platz I, Marxer A, Bühring HJ. (Intr. by Lothar Kanz) Internal Medicine II, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

Binder M, Fierlbeck G, King TP, Valent P, Bühring HJ. Individual Hymenoptera Venom Compounds Induce Upregulation of the Basophil Activation Marker Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 3 (CD203c) in Sensitized Individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; **129**: 160-168



# Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. G. Fierlbeck für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Dr. rer. nat. Hans-Jörg Bühring für die hervorragende Betreuung in der Planung und Durchführung der Experimente, für eine schöne Zeit in seinem Labor und für die Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Arbeit zu veröffentlichen.

Dem gesamten FACS-Labor-Team, insbesondere Anke Marxer, Dr. Christina Giesert, Alexandra Wahl, Angelika Lübke und Dr. Wichard Vogel, die alle jederzeit bereit waren, mir bei der Bewältigung alltäglicher „Laborproblemchen“ weiterzuhelfen.

Den Mitarbeitern/ innen des Allergielabors, die ständig auf der Suche nach neuen „Opfern“ für mich waren.

Herrn Prof. Dr. K. Dietz für die Beratung in statistischen Fragen.

Didi und meinem Bruder Jan für die Hilfe am Computer.

Meiner Freundin Sabine für ihre stetige und liebe Unterstützung.

Allen Patienten und Kontrollpersonen, die bereit waren an dieser Studie teilzunehmen und die notwendigen Blutabnahmen über sich ergehen ließen.

Und nicht zuletzt meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und mir meine Ausbildung und letztlich diese Arbeit ermöglichten.



# Lebenslauf

## Marc Martin Binder

geboren am: 25.06.1973  
in: Stuttgart-Bad Cannstatt  
Eltern: Willy Binder, geb. 15.07.1944, Steuerberater  
Lore Binder, geb. Neutz, 06.07.1948, Lehrerin  
Geschwister: Jan Binder, geb. 27.01.1976

## Schulische Ausbildung

08/80-07/84 Grund- und Hauptschule Meßstetten  
09/84-08/90 Progymnasium Meßstetten  
09/90-05/93 Gymnasium Albstadt-Ebingen  
05/1993 Abitur in Albstadt-Ebingen

## Zivildienst

08/93-10/94 Betreuung schwerstbehinderter Kinder in der Behindertenschule der Körperbehindertenförderung Neckar-Alb Mössingen

## Studium

10/1994 Beginn des Studiums der Architektur an der Universität Stuttgart  
09/1996 Vordiplom in Stuttgart  
02-04/1998 Krankenpflegepraktikum am Städtischen Krankenhaus Esslingen  
04/1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls Universität Tübingen  
27.03.2000 Ärztliche Vorprüfung  
28.08.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen  
02.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen  
12.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Friedrichshafen

## **Famulaturen**

- 04/1999 Chirurgische Klinik, Abteilung für Gefäßchirurgie, Prof. Dr. Schwilden, Städtisches Krankenhaus Esslingen
- 08-09/2000 Klinik für Innere Medizin, Abteilung für Gastroenterologie, Prof. Dr. Maier, Städtisches Krankenhaus Esslingen
- 02/2002 Studienaufenthalt im Albert-Schweitzer-Hospital in Lambarene, Gabun, Afrika
- 02-03/2002 Universitätshautklinik Tübingen, Prof. Dr. Rassner, Eberhard Karls Universität Tübingen
- 03-04/2002 Medizinische Klinik, Abteilung für Infektiologie, Prof. Dr. Suttrop, Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin
- 08-10/2002 Medizinische Klinik 1, Abteilung für Hämatologie, Prof. Dr. Geissler, Landeskrankenhaus Klagenfurt

## **Praktisches Jahr**

- 04-08/2003 Innere Medizin  
Städtisches Krankenhaus Friedrichshafen,  
Abteilung für Gastroenterologie, Prof. Dr. Lorenz-Meyer  
Abteilung für Kardiologie, PD Dr. Jäger
- 08-12/2003 Chirurgie  
Städtisches Krankenhaus Friedrichshafen,  
Abteilung für Unfallchirurgie, PD Dr. Winter  
Abteilung für Allgemeinchirurgie, PD Dr. Vogel
- 12/03-03/2004 Dermatologie  
Universitäts-Hautklinik Tübingen, Prof. Dr. Röcken,
- 06/2004 Beginn als Arzt im Praktikum an der  
Medizinischen Klinik I, Prof. Dr. G. Ehninger  
Carl-Gustav-Carus-Universität Dresden

