

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein des  
Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)  
Zentrum Allergie & Umwelt (ZAUM)  
Technische Universität und Helmholtz Zentrum München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. C. B. Schmidt-Weber)

## Basophilenaktivierungstest: Vergleich verschiedener Basophilen- Identifikationsmarker und intrazellulärer Histaminnachweis

Rebekka Carolina Hann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. B. Eberlein
2. Univ.-Prof. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann

Die Dissertation wurde am 19.12.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 22.10.2014 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Basophile Granulozyten.....	3
1.1.1 Die Rolle der basophilen Granulozyten bei der Hypersensitivitätsreaktion Typ I nach Coombs und Gell.....	4
1.2 Der Basophilenaktivierungstest.....	5
1.2.1 Prinzip und Durchführung .....	5
1.2.2 Einsatz des Basophilenaktivierungstests .....	7
1.3 Zelluläre Marker der basophilen Granulozyten.....	7
1.3.1 Identifikationsmarker.....	7
1.3.1.1 CCR3 (CD193).....	7
1.3.1.2 IgE .....	8
1.3.1.3 CRTH2 (PD2, CD294) und Anti-CD3.....	9
1.3.1.4 CD203c.....	9
1.3.2 Aktivierungsmarker .....	10
1.3.2.1 CD63.....	10
1.3.2.2 CD203c.....	11
1.4 Nachweis von Histamin .....	12
1.4.1 Der Gewebemediator Histamin .....	12
1.4.2 Histaminmessung .....	14
1.5 Zielsetzung der Studie .....	15
<b>2 Methoden und Material</b> .....	<b>17</b>
2.1 Reagenzien, Material und Geräte .....	17
2.2 Patienten und Kontrollpersonen.....	20
2.3 Protokoll „Identifikationsmarker“.....	21
2.4 Protokoll „Flow CAST®“ .....	22
2.5 Protokoll „Intrazellulärer Nachweis von Histamin“ .....	23
2.6 Vorversuche und Vergleichsversuche.....	24
2.6.1 Zellpermeabilisierung.....	24
2.6.2 Zusatz des Vollbluts.....	25
2.6.3 Puffer.....	25
2.6.4 Reagenzien-Verhältnis.....	26

2.6.5	Individuelle Kompensation .....	26
2.6.6	Protokoll "Ebo et al." .....	26
2.7	Durchflusszytometrische Analyse .....	27
2.7.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	27
2.7.2	Messung der Fluoreszenz im FACS BD LSRII .....	28
2.7.3	Darstellung und Auswertung der Daten .....	29
2.8	Statistische Methoden .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Vergleich der zellulären Marker .....	39
3.1.1	Identifikation der basophilen Granulozyten .....	39
3.1.2	Messung der Kontamination .....	46
3.1.3	Messung der Aktivierung .....	49
3.2	Intrazellulärer Nachweis von Histamin .....	56
3.2.1	Relative Zellzahl der basophilen Granulozyten .....	57
3.2.2	Aktivierung der basophilen Granulozyten.....	59
3.2.3	Indirekte Messung des intrazellulären Histamin .....	60
3.3	Vor- und Vergleichsversuche.....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1	Identifikation der basophilen Granulozyten .....	67
4.1.1	Vergleich der zellulären Marker .....	67
4.1.1.1	Der Marker CCR3 ( CD193) und seine Kombinationen .....	67
4.1.1.2	Der Marker IgE und seine Kombinationen.....	70
4.1.1.3	Der Marker CD203c und seine Kombinationen.....	72
4.1.1.4	Die Markerkombination CRTH2/CD3.....	73
4.1.1.5	Die Markerkombination CD123/HLA-DR .....	74
4.1.2	Messung der Aktivierung .....	75
4.2	Intrazellulärer Nachweis von Histamin .....	78
4.2.1	Publizierte Studien mit dem HistaFlow .....	79
4.2.2	Generelle Unterschiede zu Vorstudien des HistaFlow.....	81
4.2.3	Beurteilung der Ergebnisse und mögliche Fehlerquellen .....	81
4.2.3.1	Zusatz des Vollbluts .....	83
4.2.3.2	Zusammensetzung der Puffer und Verhältnis von Blut, Puffer und Antigen.....	84
4.2.3.3	Die Wahl der Fluorochrome.....	85
4.2.3.4	Konzentration der Antikörper.....	89

4.2.3.5 Individuelle Kompensation für jeden Probanden.....	90
4.2.3.6 Zellpermeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 .....	91
4.2.4 Zusammenfassende Beurteilung der Fehlerquellen .....	93
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>114</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>127</b>

## Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
-	negativ
Ak	Antikörper
BAT	Basophilenaktivierungstest
BD	Becton-Dickinson Biosciences GmbH
CD	Cluster of Differentiation
Cy5	Indodicarbocyanin
Cy7	Indotricarbocyanin
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward Scatter
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MCP-4	Monocyte Chemoattractant Protein-4
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells

## Abkürzungsverzeichnis

---

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A Protein
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
rpm	revolutions per minute
SA	Standardabweichung
SIT	Spezifische Immuntherapie
SSC	Side Scatter
TH1	T-Helferzelle vom Typ 1
TH2	T-Helferzelle vom Typ 2

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten wurden erstmals 1879 von Paul Ehrlich beschrieben. Namensgebend sind zahlreiche große Granula in ihrem Zytoplasma, die mit basophilem Anilin angefärbt werden können.<sup>54</sup> Der prozentuale Anteil der Basophilen an den Bluteukozyten beläuft sich im Mittel auf 0,5 bis 1 % und die mittlere Lebenszeit wird mit 60 Tagen angegeben.<sup>129,139</sup> Der Durchmesser dieser mononukleolären Zellen beträgt 10-14  $\mu\text{m}$ .<sup>6</sup> Die CD34+ Progenitorzelle dieser Zelllinie, die auch als Vorläuferzelle von Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten gilt, findet sich im Knochenmark, wo die Differenzierung bis zur murenen Zelle erfolgt, ebenso im peripherem Blut und Nabelschnurblut. Insbesondere das Interleukin 3 ist dabei für die weitere Differenzierung der Basophilen verantwortlich.<sup>6,78</sup>

Basophile Granulozyten exprimieren zahlreiche Oberflächenantigene an der Zelloberfläche, wobei insbesondere die  $\alpha\beta\gamma 2$ -Variante des hochaffinen IgE-Rezeptors  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  für diesen Zelltyp charakteristisch ist.<sup>90</sup> Dieser Rezeptor wird jedoch ebenfalls von den gewebeständigen Mastzellen exprimiert und bei beiden Zelltypen wird bei dessen Aktivierung eine IgE vermittelte Degranulation mit Freisetzung von Mediatoren ausgelöst (Siehe 1.1.1). Aufgrund dieser Gemeinsamkeit wurden die Basophilen lange Zeit als unreife, im Blut zirkulierende Mastzellen angesehen.<sup>139</sup> Auch 2 Subtypen des IgG-Rezeptors wurden auf der Zellmembran nachgewiesen, wobei  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  bei Aktivierung durch IgG zu einer Mediatorfreisetzung,  $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$  jedoch zu einer Inhibition führt. Bei gleichzeitiger Aktivierung beider Rezeptoren über ein blockierendes Inhibitionsmotiv wird ebenfalls eine Inhibition ausgelöst.<sup>5,75,110,136</sup>

Desweiteren exprimieren die basophilen Granulozyten eine Vielzahl von Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B.  $\text{IL}2\text{-R}$ ,  $\text{IL}3\text{-R}$  und  $\text{GM-CSF-R}$ , jedoch nicht das von Mastzellen exprimierte  $\text{c-kit}$ ) und Chemokinrezeptoren (z.B.  $\text{CCR}3$ ). Die Chemokinrezeptoren scheinen dabei insbesondere in der Spätphase der allergischen Reaktion für die Migration vom Blutkreislauf ins Gewebe eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>6</sup> So wurden basophile Granulozyten unter anderem bei Patienten mit Kontaktekzem und atopischer Dermatitis in der Haut, im Bronchialepithel von Asthmatikern und in der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis nachgewiesen.<sup>58</sup>

Basophile Granulozyten produzieren und sezernieren zahlreiche Effektormoleküle und Mediatorstoffe wie Histamin, Plättchen aktivierender Faktor (PAF) und Leukotrien C<sub>4</sub>, aber auch die mit TH<sub>2</sub>-Lymphozyten assoziierten Zytokine Il-4 und Il-13.<sup>130</sup>

Die Rolle der Basophilen bei der, von den Zytokinen Il-4 und Il-13 abhängigen, Typ 2-Immunantwort mit erhöhtem IgE-Level, Eosinophilie, Mastozytose und Th<sub>2</sub>-Lymphozytose im Rahmen einer allergischen Reaktion oder parasitären Infektion ist jedoch unklar. Die Hinweise auf eine herausragende Funktion für diese Th<sub>2</sub>-Antwort bei durch Antikörper transient Basophilen-depletierten Mauslinien, konnten bei transgenen Knockout-Mäusen nicht verifiziert werden.<sup>131,139</sup>

Auch die Beteiligung der basophilen Granulozyten bei der Mastzellen-unabhängigen Anaphylaxie über die Freisetzung von PAF nach Bindung von IgG1 an FcγRIII, die in einer Antikörper vermittelten Basophilen-depletierten Maus gezeigt wurde, ließ sich in der Mcpt8Cre-Knockout Maus nicht reproduzieren.<sup>110,136</sup>

Allerdings scheinen die Basophilen essentiell für die IgE-vermittelte chronische allergische Inflammation der Haut in der Maus verantwortlich zu sein. Die Rolle bei chronischen Entzündungen der Haut beim Menschen wie bei chronischer Urtikaria oder atopischer Dermatitis ist jedoch nicht hinreichend untersucht.<sup>110,131</sup>

Bei der Infektion durch Helminthen scheinen basophile Granulozyten an einer Immunität bei Reinfektion beteiligt zu sein.<sup>131</sup>

### 1.1.1 Die Rolle der basophilen Granulozyten bei der Hypersensitivitätsreaktion Typ I nach Coombs und Gell

Als Überempfindlichkeits-, oder Hypersensitivitätsreaktion wird eine überschießende Immunreaktion auf fremde Antigene bezeichnet, die zu einer Gewebeschädigung führen kann.<sup>115</sup> Nach Coombs und Gell werden diese Immunreaktionen in 4 Typen eingeteilt, wobei Typ I, welche IgE vermittelt ist, der Typ1-Allergie oder auch Soforttyp-Reaktion entspricht.<sup>13,119</sup>

Klinisch entspricht die Typ I Reaktion u.a. der allergischen Rhinitis, dem allergischen Asthma, der Urtikaria, dem Angioödem und der Anaphylaxie.<sup>119</sup>

Kennzeichnend für die Typ I Reaktion ist eine IgE-vermittelte Mastzellaktivierung und Aktivierung der basophilen Granulozyten mit konsekutiver Mediatorausschüttung. Voraussetzung für diese Hypersensitivitätsreaktion Typ I ist jedoch eine vorhergehende Sensibilisierung durch ein Antigen. Dabei werden CD4+-T-Zellen bei Präsentation des

Antigens Zytokin-gesteuert (u.a. Interleukin 4, 5, 9, 13) in Th2-Zellen differenziert. Diese produzieren Interleukin 4, welches den „Switch“ der B-Lymphozyten von einer IgM-Produktion auf antigenspezifisches IgE induziert. Auch aktivierte Mastzellen und Basophile können diesen Switch durch Interleukin 4 erzeugen. Nach der Freisetzung von spezifischem IgE bindet dieses an die hochaffinen IgE-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Mastzellen und basophilen Granulozyten.<sup>13,103</sup>

Bei einer Reexposition bindet das Antigen/Allergen an die zellständigen IgE-Antikörper und es kommt zu einer Quervernetzung, was eine Aktivierung der hochaffinen IgE-Rezeptoren zur Folge hat.

In den basophilen Granulozyten erfolgt eine Phosphorylierung der Tyrosinkinase Syk und Lyn, welche eine Signalkaskade einleitet, die in Degranulation mit Histaminfreisetzung, Aktivierung des Fettstoffwechsels mit Leukotrien 4-Produktion und Interleukinsynthese resultiert.

Dabei scheinen Syk und Lyn über die Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase Phospholipase C zu aktivieren, so dass sekundär durch Inositoltriphosphat (IP3) intrazelluläres Calcium mobilisiert wird und ein Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum einsetzt, was wiederum elementar für die Mediatorfreisetzung scheint. Die weiteren Signalwege beinhalten p38 MAPK, Calcineurin und einen Transkriptionsfaktor für Interleukin 4.<sup>57,79</sup>

Es wird zwischen der langsamen Piecemeal Degranulation und der schnellen anaphylaktischen Degranulation unterschieden. Bei der Piecemeal Degranulation findet eine progrediente Sekretion von Inhaltstoffen der Granula, vergesellschaftet mit multiplen Vesikeln im Cytoplasma aber ohne vollständige Exozytose der Granula, statt. Letztere ist jedoch bei der anaphylaktischen Degranulation zu finden.<sup>39</sup>

## 1.2 Der Basophilenaktivierungstest

### 1.2.1 Prinzip und Durchführung

Der Basophilenaktivierungstest ermöglicht die *in vitro* Analyse und Quantifizierung der Aktivierung basophiler Granulozyten durch spezifische Allergene mittels Durchflusszytometrie.

Der Test wurde von Sainte-Laudy et al. in den neunziger Jahren entwickelt, nachdem das Oberflächenantigen CD63 als Aktivierungsmarker der basophilen Granulozyten entdeckt worden war.<sup>53</sup> Mittlerweile wird das Oberflächenantigen CD203c, welches im peripheren Blut

bisher nur auf basophilen Granulozyten nachgewiesen wurde, ebenfalls als Marker für die Aktivierung genutzt. Als Identifizierungsmarker werden neben dem ursprünglichen IgE auch andere Marker wie CCR3, CRTH2 in Kombination mit Anti-CD3, Anti-HLA-DR und CD123 eingesetzt.<sup>17,28,47,53,100</sup>

Für den Basophilenaktivierungstest können sowohl isolierte Basophile als auch Vollblut verwendet werden, letzteres ist vor allem in der Routine von großem Vorteil, da es den Zeitaufwand für den Test maßgeblich verringert.<sup>28,47,47,53</sup>

Der Inkubation mit dem zu testenden Allergen (häufig in verschiedenen Konzentrationen) folgt die Färbung. Diese zwei Schritte können jedoch auch in umgekehrter Reihenfolge erfolgen. Die Färbung mit Fluorochromen an welche Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene der Basophilen gekoppelt sind, dient dabei zum einen der Identifikation dieser Zellen, als auch dem Nachweis einer möglichen Aktivierung durch das verwendete Allergen. Dabei werden die oben genannten Marker in unterschiedlichen Kombinationen angewendet.

Nach der Erythrozytenlyse (bei Vollblut), der Zellfixation und verschiedenen Waschschrinen können die Ansätze schließlich im Durchflusszytometer analysiert werden.

Zusätzlich zu den Ansätzen mit dem entsprechenden Allergen werden jeweils eine Negativkontrolle (Puffer), sowie ein bis zwei Positivkontrollen zur Überprüfung des Tests angefertigt.

Als Positivkontrolle kann ein monoklonaler oder polyklonaler Anti-IgE-Antikörper, ein Antikörper gegen den spezifischen IgE-Rezeptor FcεRI oder Formylmethionylleucophenylalanin (fMLP), ein bakterielles Peptid und Aktivator der MAPK-Kaskade und der Phospholipase C, das jedoch nicht eine IgE-vermittelte Aktivierung erzeugt, verwendet werden.<sup>39,47</sup>

Die Aktivierung bei der Negativkontrolle sollte unter 5 % liegen (in 80 % der Fälle). Grund für eine höhere Aktivierung könnte eine zeitnahe Allergenexposition vor dem Test sein. Auch während einer spezifischen Immuntherapie bei Patienten mit Insektengiftallergie wurden erhöhte Werte in der Negativkontrolle beobachtet. Auch technische Fehler, wie Verunreinigung durch Endotoxine oder Pyrogene sind auszuschließen.<sup>28</sup>

Bei der Positivkontrolle sind 5-10 % der getesteten Patienten sogenannte „Nonresponder“, d.h. es kommt zu keiner Hochregulierung von CD63 und CD203c bei der IgE-vermittelten Aktivierung.<sup>47</sup> Eine zentrale Rolle scheinen dabei die Tyrosinkinase Lyn und Syk zu spielen, da bei Nonrespondern diese nicht (Syk) bzw. nur in erniedrigter Konzentration (Lyn) nachweisbar sind.<sup>76,84</sup>

Falsch negative Ergebnisse können aber auch sowohl durch eine vorausgegangene Allergenexposition mit temporärer Refraktion der Zellen bzw. erniedrigtem IgE-Level, als auch durch lange Intervalle ohne Exposition bedingt sein. Zudem sind die Einnahme spezifischer Medikamente, insbesondere Glukosteroide, Immunmodulatoren oder Anti-IgE und eine fehlerhafte bzw. zu lange Lagerung des Bluts zu berücksichtigen.<sup>28,50,53</sup>

## 1.2.2 Einsatz des Basophilenaktivierungstests

Einsatz findet der Basophilenaktivierungstest in Fällen, wo die klinisch etablierten Methoden der Allergiediagnostik, wie Anamneseerhebung, Hauttestungen (Prick-, Epikutan-, oder Intrakutan-Test), Provokationstestungen und Bestimmung des spezifischen IgE, keine eindeutige Diagnosefindung erlauben. Dies ist z.B. von Bedeutung, wenn das Gesamt-IgE sehr niedrig ist und somit auch die Messung des spezifischen IgE erschwert ist oder aber in den Fällen, wo Hauttestungen wegen Medikamenteneinnahme, generalisierten Dermatosen oder der Gefahr eines anaphylaktischen Schocks, kontraindiziert sind. Letzteres verbietet teilweise auch gezielte Provokationstestungen.<sup>17,50,79</sup>

Heute wird der Basophilenaktivierungstest für die weiterführende Diagnostik verschiedenster IgE-vermittelter Allergien genutzt, einschließlich Allergien gegen Inhalationsallergene wie Gräser oder Hausstaubmilbe (Sensitivität bei 90 %), Nahrungsmittelallergien, Latexallergie (Sensitivität bei 90 %), Insektengiftallergie (Sensitivität bei 85-90 %) und Medikamentenallergien.<sup>51-53,56,68,124,134</sup>

Weitere mögliche Anwendungsgebiete des Basophilenaktivierungstests sind die Verlaufskontrolle der spezifischen Immuntherapie sowie der sogenannte autoimmune Basophilenaktivierungstest zum Nachweis von aktivierenden Autoantikörpern bei einer autoimmunvermittelten chronischen Urtikaria.<sup>30,51,140</sup>

## 1.3 Zelluläre Marker der basophilen Granulozyten

### 1.3.1 Identifikationsmarker

#### 1.3.1.1 CCR3 (CD193)

Das Oberflächenantigen CCR3 (CD193) ist ein Chemokinrezeptor auf der Oberfläche der basophilen Granulozyten.<sup>99</sup>

Chemokine sind Glykoproteine, die die Wanderung von Immunzellen und somatischen Zellen aus und ins Gewebe steuern.<sup>120</sup> Unterteilt werden diese Signalproteine und ihre Rezeptoren nach der Position der ersten 2 Cystinmoleküle, die entweder nebeneinander oder getrennt liegen, in 2 Subfamilien: CC Chemokine und CXC Chemokine.<sup>137</sup>

Neben den basophilen Granulozyten exprimieren auch eosinophile Granulozyten und T-Zellen, vor allem Th2-Lymphozyten und regulatorische T-Zellen den Marker CCR3.<sup>99,137</sup> Allerdings besitzen die Basophilen bis zu 20 000 Kopien von CCR3 an der Oberfläche einer einzelnen Zelle, präsentieren also eine sehr viel höhere Dichte dieses Rezeptors als andere Leukozyten.<sup>44</sup>

Der Chemokinrezeptor CCR3 besteht aus 7 Transmembran-Domänen und ist an ein G-Protein gekoppelt.<sup>137</sup> Er ist der Hauptrezeptor des Chemokins Eotaxin und spielt eine maßgebliche Rolle bei der Chemotaxis basophiler Granulozyten, aber auch die Chemokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) und MCP-4 (Monocyte Chemoattractant Protein 4), die in allergischen und inflammatorischen Prozessen beteiligt scheinen, binden daran.<sup>137, 44,101</sup>

### 1.3.1.2 IgE

Der Anti-IgE Antikörper (monoklonal oder polyklonal) war der erste Identifizierungsmarker der basophilen Granulozyten. Er bindet an die IgE-Antikörper, die wiederum an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf der Zellmembran gebunden sind.<sup>28</sup> Dabei besitzt der FcεRI Rezeptor die höchste Affinität aller Immunglobulinrezeptoren mit einer Bindungskonstante von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  M Range für IgE. Der Rezeptor existiert als Trimer ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Kette) oder Tetramer (2  $\alpha$ -, und 2  $\gamma$ -Ketten), wobei die extrazelluläre Domäne der  $\alpha$ -Kette das IgE bindet.<sup>142</sup> Er wird auch von Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert.

Trotz der breiten Anwendung sind für IgE als Identifikationsmarker mittlerweile einige Nachteile beschrieben worden. Insgesamt ist die Expression von FcεRI auf den Basophilen von Individuum zu Individuum sehr unterschiedlich, so dass ein standardisierter Vergleich von manchen Autoren als schwierig angesehen wird.<sup>24,100</sup> So ist bei einem geringen Gesamt-IgE Level auch die Dichte der hochaffinen IgE-Rezeptoren auf den Basophilen reduziert, was zu einer schwächeren Färbung und Schwierigkeiten beim Gating führt.<sup>65</sup> Ein weiterer Kritikpunkt ist die Möglichkeit der Aktivierung der basophilen Granulozyten durch Anti-IgE selbst.

### 1.3.1.3 CRTH2 (PD2, CD294) und Anti-CD3

CRTH2 ist ein Rezeptor des Prostaglandins D2 (PGD<sub>2</sub>), einem Produkt aus dem Arachidonsäure-Cyclooxygenase-Stoffwechsel, welches unter anderem während inflammatorischen Prozessen exprimiert wird und eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort im Entzündungsprozess, aber auch bei allergischen Reaktionen, zu spielen scheint. Dabei wird es vornehmlich von Mastzellen freigesetzt und induziert die Chemotaxis von Th2-Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten.<sup>47</sup>

Der Rezeptor, das sogenannte Chemoattractant Rezeptor homologe Molekül, besteht aus 395 Aminosäuren, besitzt 7 transmembranöse Domänen und ist G-Protein gekoppelt. CRTH2 ist in beinahe allen menschlichen Geweben nachgewiesen worden, die höchsten Expressionsraten wurden unter anderem im Gehirn, Herz, Magen, Nebenniere, Leber, Dünndarm, Thymus und Plazenta gefunden. Zudem wird CRTH2 auf den oben genannten Zelltypen, den Th2-Lymphozyten sowie den basophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert<sup>17,47,104</sup> Auch auf bestimmten Monozyten ließen sich geringste Level an CRTH2 nachweisen.<sup>104</sup>

In vitro wurde, nach Aktivierung des CRTH2-Signalweges, bei basophilen Granulozyten eine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium, eine Hochregulierung der CD11b und CD203c Expression sowie eine Verstärkung der IgE-vermittelten Degranulation nachgewiesen.<sup>81</sup>

Bei dem Basophilenaktivierungstest, in welchem CRTH2 als Identifizierungsmarker genutzt wird, können die eosinophilen Granulozyten anhand der Side Scatter Eigenschaften (high SSC) vor der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Zur Differenzierung zwischen Basophilen und TH2-Lymphozyten muss zusätzlich eine Anti-CD3 Färbung erfolgen, ein Oberflächenmarker der T-Lymphozyten, der nicht auf den basophilen Granulozyten zu finden ist.<sup>17,100</sup>

### 1.3.1.4 CD203c

Das Oberflächenantigen CD203c (E-NPP3, PDNP3) gehört zu einer Familie von Ecto-Nucleotid Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (E-NPP1-5).<sup>43</sup> Dabei handelt es sich um Typ II Glykoproteine, bestehend aus einer kurzen, N-terminal intrazellulären, einer transmembranösen und einer großen extrazellulären Domäne mit zwei Somatomedin B ähnlichen Motiven, einer katalytischen Region und einer C-terminalen Endonuklease-ähnlichen Domäne.<sup>15</sup>

Diese Proteinfamilie scheint bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine Rolle zu spielen, unter anderem beim Abbau von Nucleotiden, bei der Modulation von purinergen

Rezeptorsignalen, der Regulation extrazellulärer Pyrophosphatlevel sowie bei der Stimulation der Zellmotilität. Zudem wird vermutet, dass die E-NPPs in die Regulation der Insulinrezeptor Signalkaskade involviert sind.<sup>62</sup>

CD203c ist aus 875 Aminosäuren aufgebaut, hat eine molekulare Masse von 130kDa und wurde zuerst durch den monoklonalen Antikörper RB13-6 in Gliavorläuferzellen im Rattengehirn entdeckt.<sup>31,73</sup> Auch in glandulären Epithelzellen des Uterus, in der Prostata und in Colonkarzinom-Gewebe wurde CD203c nachgewiesen.<sup>21,73,144</sup>

Bei hämatopoetischen Zellen wurde CD203c auf ruhenden basophilen Granulozyten, Mastzellen und CD34+-Progenitorzellen dieser Zelllinie durch den monoklonalen Antikörper 97A6 detektiert.<sup>20,21,59,60</sup>

## 1.3.2 Aktivierungsmarker

### 1.3.2.1 CD63

Das Glykoprotein CD63, auch bekannt als LAMP3 (Lysosomal Associated Membrane Proteine) bzw. LIMP1 (Lysosomal Integral Membrane Proteine) ist ein integrales Membranprotein aus der Familie der Transmembran-4-Superfamilie (TM4SF), der Tetraspanine. Es scheint identisch zum Granulophysin der Thrombozyten zu sein und entspricht den Melanom assoziierten Antigenen ME491 und MLA sowie NGA (neuroglanduläres Antigen).<sup>32,97,106</sup>

Tetraspanine sind Proteine bestehend aus 204-355 Aminosäuren, die 4 transmembranöse Domänen sowie 2 extrazelluläre Loops (EC1 aus 20-28 Aminosäuren und EC2 aus 76-131 Aminosäuren) besitzen.<sup>93,141</sup> Bis jetzt sind 26 humane Tetraspanine identifiziert worden, wobei mit Ausnahme der Erythrozyten alle Zellen Tetraspanine exprimieren.<sup>16</sup> An der Zelloberfläche bilden Tetraspanine mit anderen Molekülen sogenannte molekulare Netze aus, die eine wichtige Rolle in verschiedensten zellphysiologischen Abläufen, wie Zellmigration und Zelladhäsion, aber auch Signaltransduktion, Costimulation oder Remodellierungsprozessen der Zellmembran, zu haben scheinen.<sup>16,82,93</sup>

Die molekulare Masse von CD63 liegt zwischen 30-60 kDa, die des Kernproteins ist bei 25 kDa beschrieben. Der ECL2-Loop besteht dabei aus 95 Aminosäuren und hat 3 N-Glykosylierungsstellen, die die Heterogenität des Antigens bedingen und vermutlich die Membran bestimmter Granula vor dem enzymatischen Abbau schützen.<sup>70,80,97,138</sup>

CD63 wurde zunächst in malignen Melanomen, Nävuszellnävus, neuroendokrinen Tumoren und Adenokarzinomen gefunden. Auch in Thrombozyten-Lysosomen, Weibel-Palade-Körperchen des Endothels und den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten wird es stark exprimiert.<sup>16</sup> Dabei ließ es sich auch intrazellulär neben den spätendosomalen und lysosomalen Glykoproteinen LAMP-1 und LAMP2 in lysosomalen Membranen nachweisen, vor allem bei vakuolären Strukturen in Nähe des Golgi Apparates.<sup>97</sup> Zudem besitzt es ein Lysosom-Ziel-Signal.<sup>16</sup>

Im hämatopoetischen System findet sich CD63 in verschiedenen Zelllinien, unter anderem in Monozyten, Mastzellen und Granulozyten.<sup>138</sup>

In ruhenden basophilen Granulozyten wurde CD63 intrazellulär in der Membran der Granula lokalisiert, vermutlich auch in den, mit Histamin gefüllten, Vesikeln, jedoch nicht auf der Zellmembran.<sup>80</sup> Nach Aktivierung der Basophilen, also nach Degranulation der Vesikel und Verschmelzung mit der Zelloberfläche, ist CD63 jedoch, nach einem Alles oder Nichts Prinzip, auf der Zellmembran nachweisbar. Diese Veränderung macht man sich beim Basophilenaktivierungstest zu Nutzen.<sup>17,28,47,80</sup>

### **1.3.2.2 CD203c**

Nach der Aktivierung basophiler Granulozyten durch die Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren, aber auch nach Stimulation durch Il-3 kommt es zu einer verstärkten Expression von CD203c an der Zelloberfläche.<sup>14,21,67,116</sup> Dabei wird bereits nach 5 min Stimulation durch die Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors das Maximum der Expression erreicht, so dass vermutlich bereits fertige, intrazellulär liegende CD203c Moleküle an die Zellmembran transportiert werden. Nach Stimulation mit Il-3 dauert die Hochregulierung ungefähr 90 min.<sup>21</sup>

Diese Veränderung der Expression nach Aktivierung lässt sich durchflusszytometrisch messen, so dass CD203c auch als Aktivierungsmarker für den Basophilenaktivierungstest genutzt werden kann.<sup>17,21,47</sup> Die Expression von CD203c an der Zelloberfläche scheint jedoch eine hohe individuelle Variabilität zu haben und ist beeinflussbar durch präanalytische Prozesse sowie immunologische Vorgänge (z.B. entzündliche Infektionen), die Il-3 beeinflussen.<sup>24</sup>

CD203c unterscheidet sich von CD63, dem zweiten Marker der basophilen Aktivierung, in den Regulationsmechanismen sowie der Kinetik der Hochregulation bei Aktivierung. So erreichen die Expression von CD63 und die Histaminausschüttung ihr Maximum erst nach 15 min, also nach dem Maximum der CD203c Expression (5min). Zudem ist CD63 nicht sensitiv für eine Stimulation mit Il-3 und wird reduziert durch TPA(Tetradecanoyl Phorbol Acetat),

einem Stimulator der Protein C Kaskade, die wiederum die Hochregulation von CD203c beschleunigte.<sup>21</sup> Beide Marker sind jedoch von Calciumionen abhängig.<sup>20</sup>

Eine Studie von Eberlein-König et al. bei 43 Patienten mit Insektengiftallergie zeigte eine vergleichbare Zuverlässigkeit der Marker CD63 und CD203c mit einer etwas höheren Sensitivität von CD203c (97 % versus 89 %) bei der Messung der basophilen Aktivierung.<sup>46</sup>

## **1.4 Nachweis von Histamin**

### **1.4.1 Der Gewebemediator Histamin**

Der Gewebemediator Histamin (2-[4-imodazol]-Ethylamin) ist ein Amin, welches im Golgi Apparat durch Decarboxylation der Aminosäure L-Histidin durch das Enzym Histidindecaboxylase mit dem Kofaktor Pyroxal-5-Phosphat synthetisiert wird. Anschließend kann es als mit anionischen Proteoglykanen und Chondroitin-4-Sulfat assoziierte Form in Granula gespeichert, oder aber sofort freigesetzt werden.<sup>55,143,105</sup>

Histamin wurde 1907 zum ersten Mal synthetisiert und 1910 von Barger, Dale und Laidlaw als Substanz Beta-1 (Beta-Imidazolethylamin) näher als Vasodepressor und Mediator für die Konstriktion glatter Muskulatur charakterisiert.<sup>27,88</sup> In den folgenden Jahren wurde dieses Amin in verschiedenen Geweben, u.a. in Lungen- und Leberparenchym nachgewiesen, der Name Histamin wurde deswegen von „ἵστωο“ (griech.) Gewebe abgeleitet.<sup>74</sup>

Die Analogie der, durch Histaminfreisetzung provozierten Effekte, mit einer anaphylaktischen Reaktion wurde bereits 1929 beschrieben, der Nachweis von Histamin in Mastzellen erfolgte jedoch erst in den 50er Jahren.<sup>118</sup> 1972 wurde Histamin schließlich in basophilen Granulozyten identifiziert und die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung aus den Basophilen nachgewiesen.<sup>72</sup>

Außer in Mastzellen und Basophilen, gastrischen enterochromaffin-ähnlichen Zellen und histaminergen Neuronen als die 4 Hauptvorkommen, wurde eine de novo Synthese von Histamin, allerdings in deutlich niedrigeren Konzentrationen, auch in anderen hämatopoetischen Zellen wie Thrombozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nachgewiesen.<sup>7,74</sup>

Die Mediatorfunktion von Histamin erstreckt sich, neben der Modulation von akuten und chronischen Entzündungsprozessen, auf eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen, wie Zellproliferation, Hämatopoese, Wundheilung, Schlafzyklus, Gedächtnis oder Hormonhaushalt.<sup>74</sup> Zudem ist die Freisetzung von Histamin verantwortlich für die typische

Klinik der allergischen Sofortreaktion mit Bronchokonstriktion, Vasodilatation, allergischer Rhinitis, Urticae, Erythem und Schmerz.<sup>7</sup>

Die Histaminwirkung wird dabei über Histaminrezeptoren vermittelt, die auf der Oberfläche der entsprechenden Zielzellen exprimiert werden. Diese Rezeptoren gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen, einer NH<sub>2</sub>-terminalen Glykosylierungsstelle und Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen.<sup>3</sup>

Es gibt 4 Subtypen von Histaminrezeptoren, die in bestimmten Zellen exprimiert werden und über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege wirken (siehe Tabelle 1). Zudem wurde eine fünfte Klasse an Histaminrezeptoren H<sub>IC</sub> beschrieben, die sich in Zellen mit sehr niedriger Histaminkonzentration intrazellulär befinden sollen.<sup>88</sup>

Tabelle 1 Histaminrezeptoren: Expressionsort, intrazelluläre Signalwege und G-Proteine<sup>74</sup>

Histaminrezeptor	Expression	Intrazelluläre Signale	G-Proteine
HR1	Nervenzellen, glatte Muskelzellen der Gefäße und der Atemwege, Hepatozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten	Ca <sup>2+</sup> , cGMP, Phospholipase D, Phospholipase A <sub>2</sub> , NFκB	G <sub>q/11</sub>
HR2	Nervenzellen, glatte Muskelzellen der Gefäße und der Atemwege, Hepatozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten	Adenylatcyklase, cAMP, c-Fos, c-Jun, PKC, p70S6K	Gα <sub>s</sub>
HR3	Histaminerge Neuronen, eosinophile Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten, geringe Expression in peripheren Gewebe, Makrophagen-unbekannt	Ca <sup>2+</sup> , MAP Kinase, Inhibition von cAMP	G <sub>i/o</sub>
HR4	Hohe Expression auf Knochenmark und peripheren hämatopoetischen Zellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, T-Lymphozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen; niedrige Expression auf Nervenzellen, Hepatozyten, peripheres Gewebe, Milz, Thymus, Lunge, Dünndarm, Dickdarm, Herz, Makrophagen-unbekannt	Ca <sup>2+</sup> , Inhibition von cAMP	G <sub>i/o</sub>

Der Abbau von Histamin und somit die Kontrolle des Histaminlevels erfolgt durch 2 metabolisierende Enzyme: Diaminoxidase und N-Methyltransferase.<sup>42</sup> Die N-Methyltransferase transmethyliert Histamin zu Telemethylhistamin, während durch die Diaminoxidase eine oxidative Deamination zu Imidazolacetaldehyd erfolgt.<sup>1</sup>

## 1.4.2 Histaminmessung

Das erste Assay zur in vitro Messung des, nach Quervernetzung der zellständigen IgE-Antikörper basophiler Granulozyten, freigesetzten Histamins wurde in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt.<sup>87</sup> Im Verlauf wurden ähnliche Assays von verschiedenen Firmen bereitgestellt.

Dabei wird entweder zu heparinisiertem Vollblut oder zu angereicherten peripheren Leukozyten bzw. purifizierten Basophilen Anti-IgE bzw. das zu untersuchende Allergen in verschiedenen Konzentrationen gegeben.<sup>26,33,122</sup> Nach einer Inkubationsphase wird der Zellüberstand, der das freigesetzte Histamin enthält, analysiert. Die Messung erfolgt dabei entweder fluorimetrisch oder als Radioimmunoassay (RIA) bzw. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).<sup>33</sup>

Die in der Literatur beschriebene Sensitivität und Spezifität dieser Assays variiert stark, so wurde für Hausstaubmilbenallergie eine Sensitivität von 87 % bzw. 94 %, für Nahrungsmittelallergien gegen Ei und/oder Milch 89 % bzw. 56 % und 53 % (abhängig vom Allergen, frisch hergestellt oder kommerzielles Kit), für Insektengiftallergie 64 % bei Wespengiftallergie und für Latexallergie sogar nur eine Sensitivität von unter 45 % beschrieben.<sup>63,86,94,95,107,113</sup> Die Sensitivität für die Bestimmung von spezifischem Anti-IgE war in den meisten publizierten Arbeiten höher<sup>33</sup>. Beim Vergleich mit dem Basophilen Aktivierungstest wurden ebenfalls höhere Sensitivitäten und Spezifitäten als bei den Histamine Release Assays gefunden.<sup>45</sup> Für die Diagnose von Medikamentenallergien wurden in vielen Studien noch niedrigere Sensitivitäten angegeben (bis 51 %).<sup>33,34</sup>

Neben der stark variierenden Sensitivität der Assays, gibt es weitere Nachteile, so dass sie bislang in der Routinediagnostik kaum Anwendung fanden. So konnte kein allgemeingültiger Cut-off-Wert für eine positive Reaktion gefunden werden und die Assays sind mit relativ hohem Zeit- und Kostenaufwand verbunden.<sup>26</sup> Zudem kann die Histaminfreisetzung nicht auf Einzelzellniveau oder zumindest auf bestimmte Zellsubpopulationen beschränkt, gemessen werden.<sup>48</sup>

Vor diesem Hintergrund entwickelte Ebo et al. den sogenannten HistaFlow, ein durchflusszytometrisches Verfahren, bei dem der klassische Basophilenaktivierungstest mit einer indirekten intrazellulären Messung des Histamins bzw. der Histaminfreisetzung auf Einzelzellniveau kombiniert werden soll. Grundlage für die Entwicklung war die Enzym-Affinitäts-Gold-Methode von Dvorak et al., um intrazelluläres Histamin in Mastzellen und basophilen Granulozyten sowie dessen Sekretion durch Exozytose nachzuweisen. Dabei

wird mit Gold gelabelte Diaminoxidase, die an das intrazelluläre Histamin bindet, elektronenmikroskopisch detektiert.<sup>38-41,48</sup>

Bei dem HistaFlow von Ebo et al. werden, nach der Aktivierung durch ein Allergen bzw. eine Positivkontrolle, mit Fluorochromen konjugierte Antikörper gegen die zellulären Marker IgE und CD203c zur Identifizierung der Basophilen verwendet. Anschließend folgen die Erythrozytenlyse und eine Permeabilisierung der Zellmembran durch Triton X 100. Das Enzym Diaminoxidase, welches an das intrazelluläre Histamin binden soll, ist ebenfalls mit einem Fluorochrom markiert und wird zuletzt zu den Ansätzen hinzugefügt. Bei der folgenden durchflusszytometrischen Analyse werden zunächst die aktivierten Basophilen identifiziert und schließlich der Histaminrelease dargestellt. Dabei sind die aktivierten Zellen, im Gegensatz zur Negativkontrolle (keine Aktivierung, DAO positiv), DAO negativ, da das Histamin und die daran gekoppelte DAO durch Exozytose aus der Zelle geschleust wurden.<sup>48</sup>

Dieses Verfahren wurde 2011 zum ersten Mal im Journal of Immunological Methods publiziert. In der Publikation wurde der HistaFlow an Patienten mit Birkenpollenallergie demonstriert und insbesondere die zwei verschiedenen Formen der Degranulation der basophilen Granulozyten, sowie deren Auftreten in Zusammenhang mit den Aktivierungsmarkern CD63 und CD203c untersucht (siehe 4.2.1).

Desweiteren wurde dieses neue Verfahren zur Messung des intrazellulären Histamins und des Histaminrelease nach Aktivierung im Verlauf einer spezifischen Immuntherapie bei Patienten mit Wespengiftallergie angewendet (siehe 4.2.1).<sup>108</sup>

### **1.5 Zielsetzung der Studie**

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit umfasste 2 Themen:

Ziel war zum einen die Etablierung des „HistaFlow“, einer Kombination des Basophilenaktivierungstests mit der indirekten Messung des intrazellulären Histamins mittels einer Fluorochrom-konjugierten Diaminoxidase. Dieses Verfahren wurde von Ebo et al. entwickelt und 2011 publiziert.

Zum anderen sollten mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie 5 zelluläre Marker für die Identifizierung der basophilen Granulozyten sowie deren Kombinationen in einer simultanen Messung in Bezug auf ihre Qualität als Identifikationsmarker untersucht werden. Die Markerauswahl umfasste CCR3, IgE, CD203c, CRTH2 und CD3. Zusätzlich wurde CD63 als

Aktivierungsmarker hinzugefügt. Als Referenz wurde der Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG verwendet.

Bei der Etablierung des HistaFlow wurde der Schwerpunkt auf die genaue Analyse des Verfahrens und Evaluation möglicher Fehlerquellen gelegt.

Der Vergleich der zellulären Marker sollte sowohl die relativen Zellzahlen der, als basophile Granulozyten identifizierten, Zellpopulationen, als auch deren Kontamination mit Nichtbasophilen einschließen. Auch die Messung der Aktivierung anhand von CD63 wurde in Bezug zur Phänotypisierung durch die verschiedenen Marker gesetzt.

Nach statistischer Auswertung und graphischer Darstellung der Ergebnisse sollte im Rahmen der Diskussion eine kritische Beurteilung der Daten verbunden mit einem umfassenden Literaturvergleich erfolgen.

## 2 Methoden und Material

### 2.1 Reagenzien, Material und Geräte

Tabelle 2: Reagenzien

<b>Reagenzien</b>			
<b>Name</b>	<b>Menge</b>	<b>Firma</b>	<b>Land</b>
<b>Flow CAST® 4x</b>			
Stimulations-Puffer	1 Flasche lyoph.	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Stimulations-Kontrolle anti-FcεRI mAκ	1 Flasche lyoph.	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Stimulations-Kontrolle fMLP	1 Flasche lyoph.	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Färbe-Reagenz anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAκ	1 Flasche 2,2 ml	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Lyse-Reagenz 10x konzentriert	1 Flasche 25 ml	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Wasch-Puffer	1 Flasche 100 ml	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
<b>Allergen</b>			
Allergen Phleum Pratense G6	6 Fläschchen	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
<b>Antikörper (Klon)</b>			
V450 Rat Anti-Human CD294 (CRTH2) (BM16)	3 Fläschchen	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
PE-Cy7™ Mouse Anti-Human CD63 (H5C6)	2 Fläschchen	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Alexa Fluor r 647 Mouse Anti-Human CD193 (CCR3) (5E8)	2 Fläschchen	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
PerCP-Cy7™ 5.5 Mouse Anti-Human CD3 (SP34-2)	2 Fläschchen	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Monoclonal Anti-IGHE-FITC antibody produced in mouse (4H10)	3 Fläschchen	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Anti-CD203c-PE, IgG1, Mouse (97A6)	1 Fläschchen	Beckmann Coulter Company	Marseille Cedex 9, Frankreich
<b>Diaminoxidase:</b>			
DAO-Horizon V500	1 Röhrchen	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
<b>Kompensations-Beads (Klon)</b>			
BD™CompBeads Anti-Rat Ig, κ (G16-510E3)	1 Fläschchen 6,0ml	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set	1 Fläschchen 6,0ml	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland

<b>weitere Reagenzien</b>			
Lyse/Fix Buffer 5X	1 Flasche 250 ml	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Perm Buffer II	1 Flasche 125 ml	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	1 Flasche 500 ml	Life Technologies GmbH (GIPCO)	Darmstadt, Deutschland
Triton X100	1 Flasche 100 ml	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Ultra Pure EDTA PH8,0/0,5m	100 ml	Life Technologies GmbH (Invitrogen)	Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethan - sulfonsäure)	500GM	Life Technologies GmbH (GIPCO)	Darmstadt, Deutschland
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	500 ml	Life Technologies GmbH (GIPCO)	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	500g	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue Stain 0,4 %	100 ml	Life Technologies GmbH (GIPCO)	Darmstadt, Deutschland
Saponin from Quillaja bark	25G	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Natriumazid	100g	Merck	Darmstadt, Deutschland
<b>Pricktest</b>			
ALK-Prick Diluent (Negativkontrolle)	2 ml	ALK Abello	Hamburg, Deutschland
Positivkontrolle (10mg/ml Histamindihydrochlorid)	2 ml	ALK-Prick ALK Abello	Hamburg, Deutschland
Pricktestlösung 006 Gräser 50.000 SBE/ml	2 ml	Allergopharma Reinbek	Reinbeck, Deutschland
destilliertes Wasser			
<b>FACS-Reagenzien</b>			
FACS-Flow		Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
FACS-Rinse		Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
FACS-Clean		Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland

Tabelle 3: Materialien

<b>Materialien</b>			
<b>Name</b>	<b>Größe</b>	<b>Firma</b>	<b>Land</b>
<b>Pipetten</b>			
Eppendorf Reference	10-100 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	100-1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Swift Pet +		HT Labor + Hospitaltechnik AG	Heideck, Deutschland
<b>Pipettenspitzen</b>			
ep T.I.P.S. Standardk	2-200 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	50-1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
sterile Pipetten Cellstar	2 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
	5 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
	10 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
	25 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
<b>Blutentnahme</b>			
Scalp Vein Set		Dahlhausen	Köln, Deutschland
Multi-Adapter für S-Monovette		Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 9 ml K3E	9 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
LH-Trace Metal Analysis	7,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 7,5 ml Z	7,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
<b>Sonstige Materialien</b>			
mediprick Allergie Lanzetten		Servoprax	Wesel, Deutschland
Laborglasflaschen	250 ml	Duran Group GmbH	Wertheim, Deutschland
50 ml Tube	50 ml, 114x28mm	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Eppendorfcups	1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom-Tube	5 ml	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

<b>Geräte</b>		
<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Land</b>
<b>Wasserbad</b>		
Schüttelwasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
<b>Zentrifuge</b>		
Universal 32R	Hettich GmbH	Gerlingen, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
<b>Durchflusszytometer</b>		
FACScalibur	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
BD LSRFortessa	Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
<b>Zählkammer</b>		
0,1mm Assistent Neubauer	Neubauer	
<b>Vortex-Mischer</b>		
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, New York, USA
Vortex-Mixer	Neolab	Heidelberg, Deutschland
<b>ImmunoCAP</b>		
ImmunoCAP 250	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<b>PH-Meter</b>		
inoLab pH7110	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH	Weilheim, Deutschland

## 2.2 Patienten und Kontrollpersonen

Es wurden 10 Personen (6 Frauen, 4 Männer) im Alter von 24 bis 51 (mittleres Alter 31,4) mit nachgewiesener Gräserpollenallergie, sowie 3 Kontrollpersonen (2 Frauen, 1 Mann) im Alter von 18 bis 52 (mittleres Alter 30) untersucht.

Die Gräserpollenallergie wurde bei typischer klinischer Anamnese diagnostisch mittels eines Prick-Hauttests (Gräser, Positiv-Kontrolle (Histamin), Negativkontrolle (NaCl)), sowie einer Bestimmung des spezifischen IgE gegen Gräser mittels ImmunoCAP (ImmunoCAP 250, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) gesichert.

Nach hinreichender Aufklärung über den Versuch, sowie eindeutiger Einverständniserklärung seitens der Probanden, erfolgte nach den Bestimmungen der Ethikkommission der Technischen Universität München die venöse Blutentnahme. Dabei wurden jeweils eine Serummonovette und eine EDTA-haltige Monovette verwendet.

Die Probanden und Kontrollpersonen hatten 2 Wochen vor der Blutentnahme keine Glukokortikoidtherapie erhalten, antihistaminerge Medikamente waren mindestens 48 h zuvor abgesetzt worden. Akute Infektionen, chronische Entzündungsprozesse sowie momentane Symptome einer Typ I Allergie wurden anhand Anamneseerhebung und klinischer Beobachtung ausgeschlossen.

## **2.3 Protokoll “Identifikationsmarker”**

Für den Vergleich der verschiedenen zellulären Marker zur Identifizierung der basophilen Granulozyten und den BAT wurde weitgehend das Protokoll des Flow CAST® von der Firma Bühlmann Laboratories AG übernommen. Allerdings wurde nach Vergleichsversuchen anstatt des Lyse-Reagenz und des Waschpuffers von Bühlmann der Lyse/Fix Buffer 5X von BD Biosciences sowie 0,1 % Natriumazid (in PBS) verwendet.

Zur Vorbereitung wurde der lyophilisierte Stimulationspuffer (mit 3 ng/ml IL-3) mit 50 ml Pyrogen-freiem Reinstwasser rekonstituiert und anschließend die beiden Stimulationskontrollen (anti-FcεRI mAk und fMLP) in jeweils 1,5 ml Stimulationspuffer gelöst. Der Lyse/Fix Puffer von BD wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und im Wasserbad, welches auf 37 °C erhitzt wurde, vorgewärmt. Das Allergen Phleum Pratense G6 von Bühlmann wurde mit 250 µl Stimulationspuffer auf eine Allergenkonzentration von 100ng/ml verdünnt. Danach wurde eine weitere Verdünnung auf 25 ng/ml (57,5 µl von dem verdünnten Allergen und 172,5 µl Stimulationspuffer) hergestellt. Das Salz Natriumazid wurde mit PBS auf eine 0,1 %ige Lösung verdünnt. Da der Antikörper PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD63 (H5C6) von BD eine hohe Intensität aufwies, wurde er, nach Versuchsreihen mit verschiedenen Verdünnungskonzentrationen, in einem Verhältnis von 1:40 ebenfalls mit Stimulationspuffer verdünnt (10 µl Antikörper in 390 µl Stimulationspuffer).

Das Protokoll enthielt 4 Ansätze: In die Negativ-Kontrolle wurde 50 µl Stimulationspuffer, in die Positiv-Kontrolle 1 50 µl Stimulationskontrolllösung 1(anti-FcεRI mAk), in die Positiv-Kontrolle 2 50 µl Stimulationskontrolllösung 2 (fMLP) und in den Allergenansatz 50 µl verdünntes Allergen gegeben. Anschließend kamen jeweils 100 µl Stimulationspuffer und 50 µl Vollblut in EDTA hinzu und wurden mit der Pipette durchmischt.

Daraufhin wurden die Antikörper hinzugefügt, jeweils in jeden Ansatz 10 µl V450 Rat Anti-Human CD294 (CRTH2) (BM16), PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD63 (H5C6), Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD193 (CCR3) (5E8), PerCP-Cy™ 5.5 Mouse Anti-Human CD3

(SP34-2), Monoclonal Anti-IGHE-FITC (4H10) und Anti-CD203c-PE (97A6). Die Allergenendkonzentration im Allergenansatz betrug somit 4,8 ng/ml. Nach erneutem Mischen folgte für 20 min die Inkubation im 37°C heißen Wasserbad. Nun wurde jeweils 1 ml bereits verdünnter und vorgewärmter Lyse/Fix Buffer hinzugegeben und die Ansätze erneut für 20 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben 10 min bei 4°C und 2400 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstands erfolgte eine Waschung mit 2 ml PBS und erneute Zentrifugation bei 2400rpm für 10 min. Das Zellpellet wurde schließlich mit 600 µl 0,1%iger Natriumazidlösung suspendiert und innerhalb von 2 Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung.

## **2.4 Protokoll „Flow CAST®“**

Beim Protokoll „Flow CAST®“ wurden 4 Ansätze (Negativkontrolle, Positivkontrolle 1 und 2 und ein Ansatz mit Gräserallergen Phleum Pratense G6 (25 ng/ml) von Bühlmann strikt gemäß des Flow CAST®-Manuals vorbereitet.

Dabei wurden der Stimulationspuffer (enthält 3 ng/ml IL-3) und die beiden Stimulationskontrollen (anti-FcεRI mAk und fMLP) wie im Protokoll „Identifikationsmarker“ hergestellt. Das Allergen Phleum Pratense G6 von Bühlmann wurde mit 250 µl Stimulationspuffer ebenfalls auf eine Allergenkonzentration von 100 ng/ml verdünnt. Danach wurde eine weitere Verdünnung auf 25 ng/ml (57,5 µl von dem verdünnten Allergen und 172,5 µl Stimulationspuffer) hergestellt. Das Färbereagenz mit den Antikörpern Anti-CD63-FITC und Anti-CCR3-PE mAK und der Waschpuffer waren bereits gebrauchsfertig. Das Lyse-Reagenz wurde mit 225 ml deionisiertem Wasser verdünnt.

Das Protokoll enthielt 4 Ansätze: In die Negativ-Kontrolle wurde 50 µl Stimulationspuffer, in die Positiv-Kontrolle 1 50 µl Stimulationskontrolllösung 1(anti-FcεRI mAk), in die Positiv-Kontrolle 2 50 µl Stimulationskontrolllösung 2 (fMLP) und in den Allergenansatz 50 µl verdünntes Allergen gegeben. Anschließend kamen jeweils 100 µl Stimulationspuffer und 50 µl Vollblut in EDTA hinzu und wurden mit der Pipette durchmischt.

Anschließend wurden in jeden Ansatz je 20 µl Färbereagenz hinzugegeben, so dass die Allergenendkonzentration 5,7 ng/ml betrug. Nach erneutem Mischen folgte eine 15minütige Inkubation in 37°C warmen Wasserbad. Daraufhin wurden die Ansätze nach Zusatz von je 2 ml Lyse-Reagenz für 7min bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Schließlich wurden die

Proben 5min bei 2400rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellpellets in 300 µl Waschpuffer resuspendiert. Die FACS-Analyse folgte innerhalb von 2 Stunden.

## **2.5 Protokoll „Intrazellulärer Nachweis von Histamin“**

Das Protokoll zum Intrazellulären Nachweis von Histamin orientierte sich an den Vorgaben, die Ebo et al. 2012 im Journal of Immunological Methods publizierten<sup>48</sup>. Es wurden insgesamt 5 Ansätze angefertigt. Zusätzlich zu den beiden Positivkontrollen, zur Negativkontrolle und zum Ansatz mit Gräserallergen, kam ein Kontrollansatz ohne Triton (PBS) hinzu, bei welchem keine Zellpermeabilisierung erfolgte und der als Kontrolle für die intrazelluläre Färbung der anderen Ansätze genutzt werden konnte.

Es wurden sowohl der Stimulationspuffer als auch die beiden Stimulations-Kontrollen (anti-FcεRI mAk und fMLP) des Flow CAST® benutzt (Vorbereitung siehe Kapitel 2.3). Auch das Allergen Phleum Pratense G6 von Bühlmann wurde, wie bei den vorherigen Protokollen, auf eine Konzentration von 25 ng/ml mit dem Stimulationspuffer verdünnt. Zur Zelllyse und Fixierung diente erneut der, im Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnte und bei 37°C vorgewärmte, Phosflow Lyse/Fix Buffer 5X von BD. Die Natriumazidlösung (0,1% in PBS) des Protokolls „Zelluläre Marker“ wurde ebenfalls wieder verwendet.

Desweiteren wurde in der Vorbereitung Triton X100 mit PBS zu einer 0,1 %igen Lösung verdünnt und ein PH-Wert von 7,4 eingestellt.

Zu Beginn des Protokolls wurden jeweils 100 µl Stimulationskontrolle 1 und 2 als positive Kontrollansätze, 100 µl Stimulationspuffer als Negativkontrolle und als Kontrollansatz für die intrazelluläre Färbung sowie 100 µl Allergen mit 200 µl Vollblut und 200 µl Stimulationspuffer versetzt und für 20min im 37°C heißen Wasserbad inkubiert.

Nach dieser Aktivierungsphase wurde 1 ml eisgekühltes PBS hinzugeben und die Ansätze für 10 min und 2400rpm bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden in jeden Ansatz jeweils 10 µl Anti-IGHE-FITC (4H10), Anti-CD203c-PE (97A6) und auf 1:40 verdünnter PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD63 (H5C6) hinzugegeben. Es folgte eine 20minütige Inkubation bei 4°C. Die Allergenendkonzentration im Allergenansatz betrug 4,7 ng/ml.

Im Anschluss wurde jede Probe zusätzlich mit 2 ml Phosflow Lyse/Fix Puffer versetzt und für weitere 20min in 37°C heißem Wasserbad inkubiert.

Schließlich erfolgte eine erneute 10minütige Zentrifugation mit 2400rpm, der Überstand wurde verworfen und 4 der 5 Zellpellets mit 2 ml 0,1 % Triton in PBS gewaschen (10min bei 2400rpm). Der Kontrollansatz ohne Triton (PBS-Kontrolle) wurde nur mit PBS gewaschen.

Daraufhin wurden in die 2 Positivkontrollen, die Negativkontrolle sowie in den Allergenansatz weitere 100 µl 0,1 % Triton in PBS sowie 10 µl DAO-V500 gegeben. Die PBS-Kontrolle wurde erneut nur mit 100 µl PBS ohne Triton, jedoch ebenfalls mit 10 µl DAO-V500 versetzt.

Nach einer 45minütigen Inkubation im 37°C heißen Wasserbad folgte nach Zugabe von 2 ml PBS eine letzte 10minütige Zentrifugation (2400rpm). Dann wurden die Zellpellets mit 600 µl 0,1 % Natriumazid in PBS resuspendiert und innerhalb von 2 h im FACS analysiert.

## **2.6 Vorversuche und Vergleichsversuche**

### **2.6.1 Zellpermeabilisierung**

Um die Permeabilisierung zu optimieren, wurden in Vorversuchen höhere Konzentrationen der Triton X-Lösung (0,25 %, 0,5 %, 5 %) verwendet. Dabei wurde zunächst das Flow CAST®-Protokoll angewandt, nach der Zelllyse und 5minütiger Zentrifugation (2400rpm) erfolgte jedoch die Resuspension mit 600 µl der entsprechenden Triton X-Lösung mit anschließender Zugabe von 10 µl DAO-Horizon V500 und 45minütiger Inkubation im 37°C heißen Wasserbad. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspension in 600 µl 0,1 %iger Natriumazidlösung und durchflusszytometrische Analyse. In gleicher Weise wurde in einem Vorversuch zur Permeabilisierung der BD Phosflow Perm Buffer II eingesetzt.

In einem weiteren Vergleichsversuch wurde das Protokoll „Intrazellulärer Histaminnachweis“ durchgeführt und in einer zusätzlichen Negativkontrolle eine 5 %ige Triton X-Lösung verwendet.

Als alternative Permeabilisierungs-Methoden wurde zudem ein Saponin-Protokoll, das von Ebo et al. in einer Publikation über die kombinierte durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Signalen und Immunophänotypisierung von basophilen Granulozyten angewendet wurde, durchgeführt.<sup>49</sup> Dabei wurde das Protokoll „Identifikationsmarker“ durchgeführt und nach der Zelllyse und Zentrifugation die Zellpellets mit 2 ml 0,3 % Saponin (in PBS gelöst) resuspendiert und für 30min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte eine erneute Resuspension in 100 µl Saponin plus 10 µl DAO-Horizon V500 mit nachfolgender 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die

Proben erneut 10min zentrifugiert und vor der durchflusszytometrischen Messung mit 600 µl 0,1 % Natriumazid in PBS gelöst.

Um die generelle Wirkung des angewendeten Triton X-100 auf die Leukozyten zu untersuchen und eine Permeabilisierung nachzuweisen, wurde 200 µl Vollblut (jeweils mit entweder EDTA- oder Heparin-Zusatz) nach dem Protokoll „Intrazellulärer Nachweis von Histamin“, jedoch ohne Antikörper und DAO sowie ohne Allergen bzw. Stimulationskontrollen, verarbeitet. Dabei wurden verschiedene Triton-Konzentrationen (0,1 %, 0,5 %, 5 %) verwendet. Bei einem Anteil aller Proben erfolgte die Färbung mit Trypanblau nach der ersten Waschung mit Triton X. Die Rest-Suspensionen wurden erst nach der 45minütigen Inkubation mit DAO und Triton X angefärbt. Nach der Färbung folgte jeweils unmittelbar die mikroskopische Beurteilung in der Zählkammer. Dieser Versuchsaufbau wurde mit aufgereinigten PBMCs mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

## 2.6.2 Zusatz des Vollbluts

Da Ebo et al. in ihrem Protokoll „HistaFlow“ nicht mit EDTA-versetztes Vollblut, sondern heparinisertes Vollblut nutzen, wurde in Vergleichsversuchen ebenfalls der Zusatz Heparin (in LH-Trace Metal Analysis, Saarstedt, Nürnberg, Deutschland) verwendet. Dabei wurde das Protokoll „Intrazellulärer Nachweis von Histamin“ (siehe Kapitel 2.5) angewendet.

## 2.6.3 Puffer

In Vergleichsversuchen wurde im Protokoll „Intrazellulärer Histaminnachweis“ auch der Puffer von Ebo et al. anstatt des Stimulationspuffers der Firma Bühlmann Laboratories AG verwendet. Die Zusammensetzung des Puffers ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Puffers (20 ml) nach Ebo et al. (persönliche Mitteilung)

Puffer 20 ml	
Inhaltsstoff	Volumen
Destilliertes Wasser	17,1 ml
HBSS	1,9 ml
Natriumhydrogencarbonat 7,5 % Lsg.	0,6 ml
HEPES	0,4 ml

## 2.6.4 Reagenzien-Verhältnis

Auch das Verhältnis des Blutvolumens zum verwendeten Antigen (Allergen/fMLP/anti-FcεRI mAk) und zum Puffer wurde in Vergleichsversuchen verändert und analog zum Flow CAST® berechnet. So wurden bei 200 µl Blut (Flow CAST® 50 µl Blut) 200 µl Antigen und 400 µl Puffer bei ansonsten gleichem Protokoll „Intrazellulärer Histaminnachweis“ verwendet.

## 2.6.5 Individuelle Kompensation

Die Kompensationseinstellungen für die genutzten Antikörper wurden vor Beginn der Messungen anhand von CompBeads von BD Biosciences (BD™CompBeads Anti-Rat Ig, κ (G16-510E3), Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set) durchgeführt. Diese Parameter wurden anschließend nicht mehr verändert, sondern für jeden Probanden angewendet. Die Arbeitsgruppe Ebo hingegen korrigierte, wegen einer möglichen basophilen Autofluoreszenz nach Aktivierung, bei jedem Patienten einzelne Kompensationswerte. Um diese auszugleichen, wurden immer 4 Kompensationsansätze nach folgendem Schema (Tabelle 6) angefertigt (persönliche Mitteilung Dr. C.H. Bridts).

**Tabelle 6: Protokoll der 4 Kompensationsansätze zur Korrektur der Autofluoreszenz nach Ebo et al. (persönliche Mitteilung)**

	63-dao-	63-dao+	63++dao+	63++dao-
Puffer	200 µl	200 µl	200 µl	-
Anti-IgE (in dieser Arbeit Anti-FcεRI)	-	-	-	200 µl
Inkubation				
CD63	-	-	-	-
IgE/203c in	20 µl/10 µl	20 µl/10 µl	20 µl/10 µl	20 µl/10 µl
Fixierung mit Lyse/Fix Puffer				
Waschen mit PBS und 0.1 % TritonX				
TritonX	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
CD63	-	-	10 µl	10 µl
DAO	-	40 µl	40 µl	40 µl
Population				
bei korrekter Kompensation	graue Pop. Q3	graue Pop. Q1	blaue Pop. Q2	rote Pop. Q4

In Vergleichsversuchen wurden diese Kompensationsansätze ebenfalls nach dem in Tabelle 6 beschriebenen Schema angefertigt.

## 2.6.6 Protokoll “Ebo et al.”

In einem weiteren Vergleichsversuch wurden schließlich, wie bei Ebo et al., 200 µl heparinisieretes Vollblut und 200 µl Antigen verwendet (keine Zugabe von zusätzlichem Puffer). Da nur eine Negativkontrolle und eine PBS-Kontrolle angefertigt wurden, wurde als

Antigen jeweils 200 µl Puffer, nach Tabelle 5 (Kapitel 2.6.3) angefertigt, genutzt. Die weitere Durchführung entsprach dem Protokoll „Intrazellulärer Histaminnachweis“.

## 2.7 Durchflusszytometrische Analyse

### 2.7.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer, auch FACS (engl. Fluorescence-Activated-Cell-Sorter) genannt, können spezifische Eigenschaften, wie die relative Größe (Vorwärtsstreulicht-FSC), die relative Granularität (Seitwärtsstreulicht-SSC) und die relative Fluoreszenzintensität von einzelnen Partikeln, insbesondere Blutzellen, gemessen werden. Ein Durchflusszytometer besteht dabei aus 3 Komponenten, dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System und der Signalverarbeitung.<sup>12,138</sup>

Das Flüssigkeitssystem dient der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung. Dabei erzeugt eine Hüllkammer mit schnell strömender Flüssigkeit um den zentralen Kanal mit der Zellsuspension einen Unterdruck, so dass die einzelnen Zellen ihre Fließeigenschaften ändern und schließlich hintereinander aufgereiht einzeln analysiert werden können.

Das optische System besteht aus einem oder mehreren Lasern als Lichtquellen, einer Sammeloptik mit Spiegeln und verschiedenen Filtern, welche durch Herausfiltern bestimmter Wellenlängen die Spezifität der Messung erhöhen, sowie den Detektoren. Als Detektoren werden entweder Photodioden (weites Spektrum, aber weniger sensitiv und deshalb nur für FSC geeignet) oder sogenannte Photomultiplier-Röhren (PMTs, hohe Sensitivität, aber kleines Spektrum) verwendet.<sup>23</sup>

Durchlaufen die einzelnen Zellen den ausgesandten Laserstrahl, kommt es zu 2 messbaren Streuphänomenen: Dabei korreliert die Intensität des sogenannten „Forward Scatter“ (Streuung nach vorne, 20° zur Laserstrahlachse gemessen) mit der Größe der Zelle und der „Side Scatter“ (Streuung zur Seite, 90° zur Achse gemessen) gibt Informationen über die Granularität. Sind bestimmte Epitope der Zellen zuvor mit Fluorochromen markiert worden, können diese zusätzlich bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen werden (siehe 2.5.2.).<sup>117</sup>

An den Detektoren beginnt die Signalverarbeitung. Trifft der Lichtstrahl dort auf, entsteht ein elektrischer Strom, dessen Amplitude der Spannung proportional zur Anzahl der, auf dem Detektor empfangenen, Photonen ist. Diese Spannung wird schließlich amplifiziert und die

Messungen digitalisiert, sodass in der entsprechenden Software eine graphische Darstellung als Punktdiagramm (Dotplot) erfolgen kann (siehe 2.5.3).<sup>117</sup>

## 2.7.2 Messung der Fluoreszenz im FACS BD LSRFortessa™

Um bestimmte Oberflächenantigene aber auch intrazelluläre Strukturen von Zellen zu erkennen und zu messen, werden in der Durchflusszytometrie Fluorochrome, also Farbstoffe, die jeweils mit spezifischen Antikörpern gegen die entsprechenden Strukturen konjugiert sind, genutzt. Diese Fluorochrome absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, werden durch den Laser angeregt und emittieren schließlich wieder Licht mit einer längeren Wellenlänge, welches dann von spezifischen Fluoreszenzdetektoren gemessen wird.<sup>111</sup>

Auf atomarer Ebene werden die Elektronen des Fluorochroms durch das Licht des entsprechenden Lasers kurzfristig auf ein höheres Energielevel gebracht. Nach einigen Nanosekunden fallen die Elektronen wegen einer Konformationsänderung des Fluorochroms unter Wärmeabgabe auf ein niedrigeres Energielevel zurück. Schließlich kommen die Elektronen dann von dort wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau. Die Energie die dabei frei wird ist die sogenannte Emissionsenergie oder auch Fluoreszenz, die kleiner ist als die Energie des Lichts, welches zu Beginn absorbiert wurde. Demnach hat die Fluoreszenz eine größere Wellenlänge als das Licht des Lasers. Diese Differenz nennt sich Stokes-Verschiebung, je größer diese ist, umso besser lässt sich zwischen Licht des Lasers und Fluoreszenz unterscheiden und umso geeigneter ist das Fluorochrom.<sup>117</sup>

Es gibt verschiedene Fluorochrome, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Werden mehrere Fluorochrome synchron verwendet, besteht, bei ähnlichen Emissionsprofilen, die Möglichkeit der Überlappung der jeweiligen Emissionsspektren. Um Fehlmessungen zu verhindern, erfolgt eine rechnerische Kompensation bei der Datenanalyse, wobei der Anteil des Spektrums von Fluorochrom B, welcher auch von dem Fluoreszenzdetektor A gemessen wird, von der Fluoreszenz des Farbstoffs A subtrahiert wird und man so die wirklich gemessene Fluoreszenz des Farbstoffs A erhält.

In den Experimenten dieser Arbeit wurden die Fluorochrome PE (Phycoerythrin), FITC (Fluorescein Isothiocyanate), Horizon 450, Horizon 500, Alexa Fluor 647 (Rhodamin-Derivat), PE-Cy7 (Phycoerythrin plus Indotricarbocyanine) und PerCP-Cy™5.5 (Peridinin-Chlorophyll-A Protein plus Indodicarbocyanine) verwendet. Tabelle 7 fasst die Eigenschaften dieser Fluorochrome zusammen.

Tabelle 7: Fluoreszenz, Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum der verwendeten Fluorochrome<sup>11</sup>

Fluorochrom	Fluoreszenz/Emmisionsfarbe	Exzitationsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Horizon V450	blau	404	448
Horizon V500	grün	415	500
FITC	grün	494	519
PE	gelb	496,564	578
Alexa Fluor 647	rot	650	668
PerCP-Cy5.5	dunkelrot	482	695
PE-Cy7	infrarot	496,564	785

Die Messungen wurden dabei ausschließlich an dem Durchflusszytometer FACS BD LSRFortessa™ durchgeführt, welches 4 Laser besitzt (Violet Laser (405 nm), Blue Laser (488 nm), Red Laser (630 nm) und Ye-Gr Laser (561 nm)).

Für die erforderlichen Kontrollmessungen vor der Kompensation der, in den Experimenten verwendeten, Fluorochrome wurden die BD™CompBeads Anti-Rat Ig, κ (G16-510E3) sowie das Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set von BD verwendet.

### 2.7.3 Darstellung und Auswertung der Daten

Wie im Kapitel 2.5.1 erläutert, werden die optischen Signale an den Detektoren in elektrische Signale umgewandelt, die schließlich digital aufbereitet werden und in ein- und zweidimensionalen Diagrammen darstellbar sind. Bei den sogenannten Punktdiagrammen (engl. Dotplot) entspricht jeder Punkt genau einer Zelle, wobei sich diese nach ihren spezifischen Eigenschaften bzw. ihrer Fluoreszenz in Zellwolken gruppieren.

Um eine Vorauswahl der zu analysierenden Zellen zu treffen, wendet man eine sogenannte Gating-Strategie an, indem um Zellwolken, die man bezüglich bestimmter Eigenschaften untersuchen will, ein Auswertungsfenster (Gate) gelegt wird und in folgenden Diagrammen nur diese Zellen betrachtet werden.<sup>138</sup> Eine weitere Differenzierung erfolgt durch das Setzen von Quadranten in die Dotplot-Ebene. So wird zum Beispiel definiert, welche Zellen mit einem entsprechenden Fluorochrom markiert worden sind und somit als Fluorochrom-positiv gelten.

Sowohl bei der Analyse der verschiedenen zellulären Marker der basophilen Granulozyten, als auch in der Auswertung des Flow CAST® und des HistaFlow wurden die Zellen zunächst im Forward Scatter / Side Scatter Diagramm (linear), nach Größe und Granularität geordnet, dargestellt (Beispiel siehe Abbildung 1).

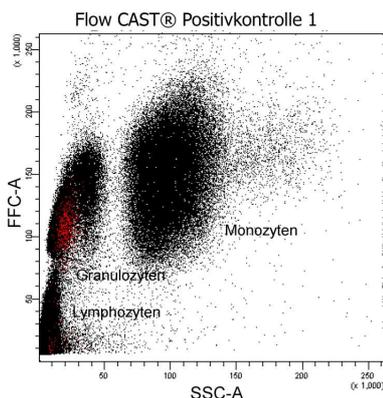


Abbildung 1: Forward Scatter / Side Scatter Diagramm (FSC/SSC) am Beispiel des Flow CAST®. Die Zellen werden nach Größe und Granularität geordnet dargestellt: Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten

Um die zellulären Marker und ihre Eignung bzw. Spezifität für die Identifizierung der basophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde das jeweilige Fluorochrom des Markers CCR3, IgE, CRTH2 oder CD203c (logarithmisch), wie beispielhaft in Abbildung 2 zu sehen, in Bezug zum Side Scatter (linear) gesetzt. Das Gate für die basophilen Granulozyten wurde entsprechend um die, für das Fluorochrom positive, Zellpopulation mit den passenden SSC-Eigenschaften gesetzt.

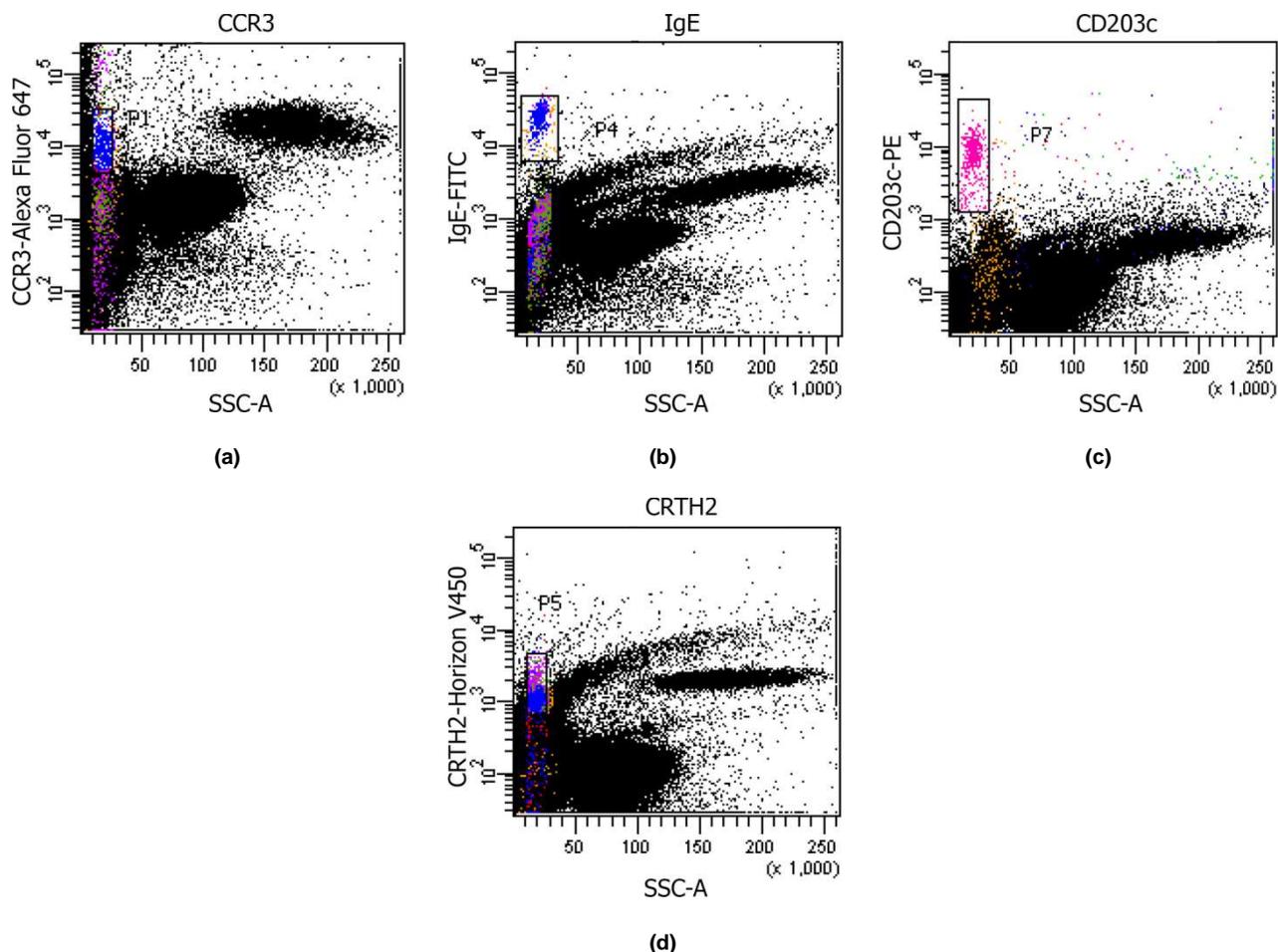


Abbildung 2: Gate der basophilen Granulozyten bei CCR3 (a), IgE (b), CD203c (c) und CRTH2 (d)

Anschließend wurden diese Zellen gegen einen weiteren positiven (CCR3, IgE, CRTH2, CD203c) oder negativen (CD3) additiven Identifizierungsmarker im Dotplot aufgezeichnet (siehe Abbildung 3). So konnte ein möglicher positiver Effekt der Kombinationen auf die Identifizierung der Basophilen untersucht werden.

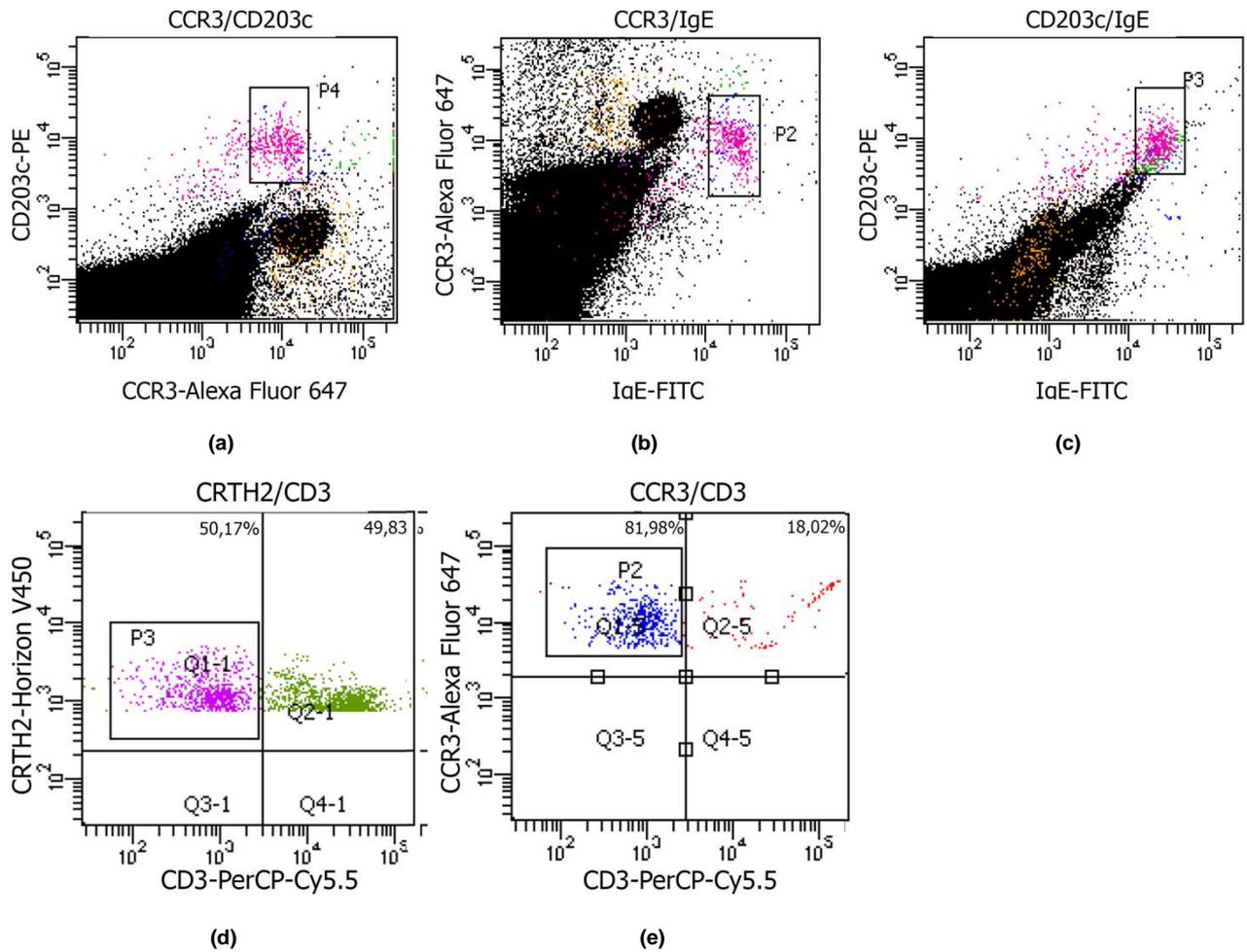


Abbildung 3: Markerkombination CCR3/CD203c (a), CCR3/IgE (b), CD203c/IgE (c), CRTH2/CD3 (d) und CCR3/CD3 (e)

Für die Beurteilung der Kontamination der Zellen im Basophilen-Gate der Marker durch andere Zellen wurden die Zellen des Gates in Dotplots mit den Kontaminationsmarkern CCR3<sup>+</sup> und CD203c<sup>-</sup> gesetzt (siehe Abbildung 4). Die Kontamination mit CD3<sup>+</sup>-Zellen wurde aus den Dotplots der Abbildung 4 abgelesen. Beschrieben wurde die Kontamination als prozentualer Anteil der Nichtbasophilen an der Gesamtzellzahl des Basophilen-Gates.

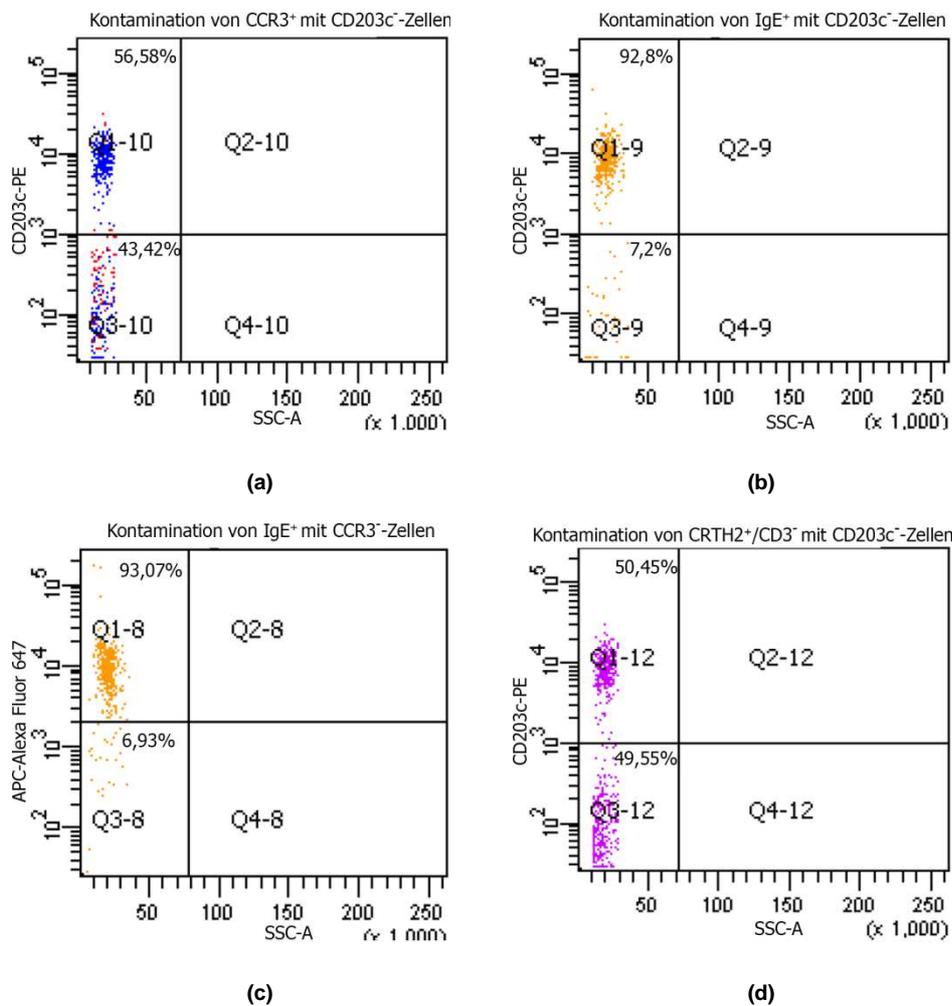


Abbildung 4: Messung der Kontamination: CCR3/CD203c<sup>-</sup> (a), IgE/CD203c<sup>-</sup> (b), IgE/CCR3<sup>+</sup> (c) und CRTH2/CD3<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup> (d). Die Kontaminationen sind in Quadrant Q3-10 (a), Q3-9 (b), Q3-8 (c) und Q3-12 (d) zu sehen.

Schließlich wurde die Aktivierung der basophilen Granulozyten der beiden Positivkontrollen bzw. des Allergenansatzes in den verschiedenen Gates anhand des Aktivierungsmarkers CD63 beurteilt. Dabei wurden die Identifikationsmarker (Abszisse) und CD63 (Ordinate) in Korrelation gebracht (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). Anhand der Negativkontrollen konnten die Quadranten als Cut-off für alle Ansätze gesetzt werden.

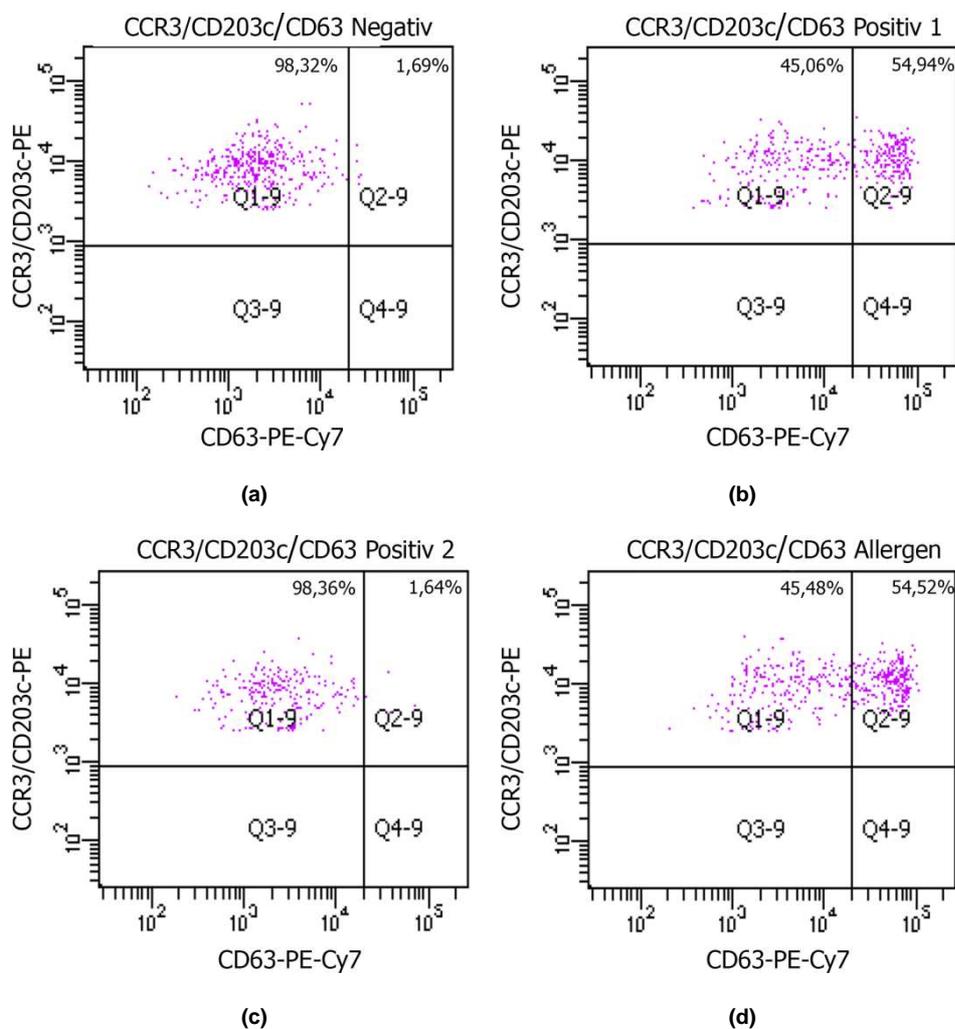


Abbildung 5: Messung der Aktivierung am Beispiel der CCR3/CD203c Population in der Negativkontrolle (a), Positivkontrolle 1 (b), Positivkontrolle 2 (c) und im Allergenansatz (d).

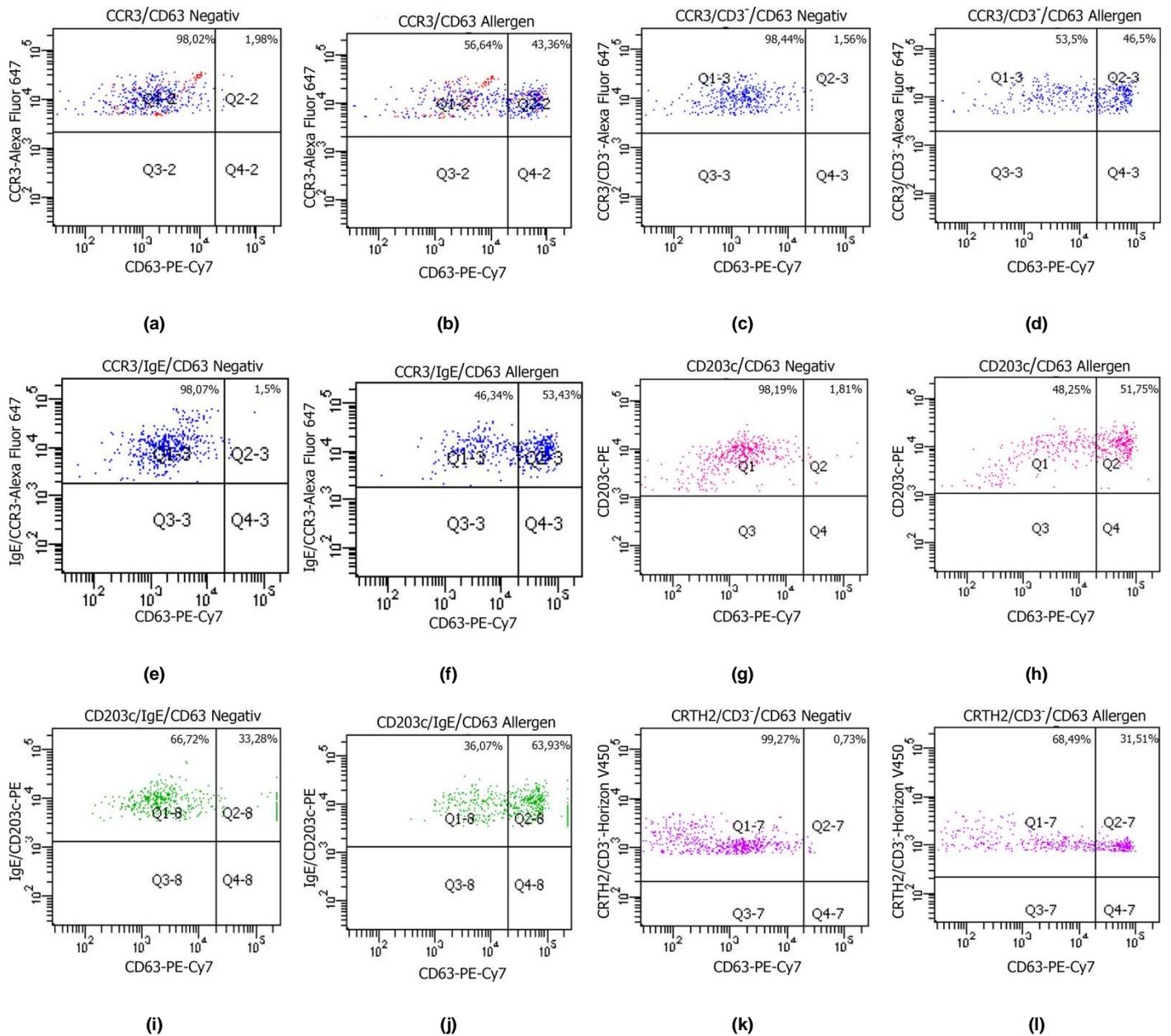
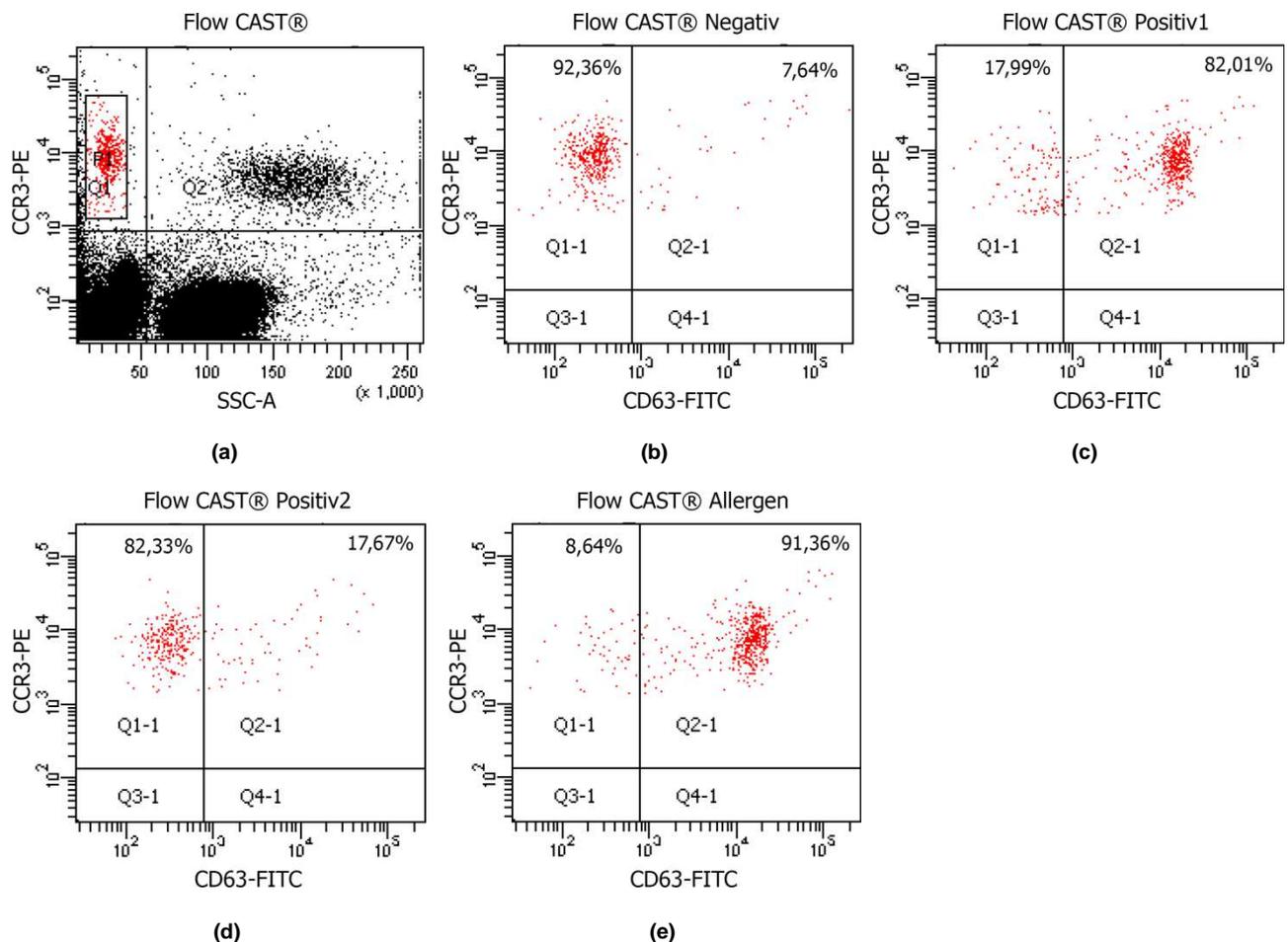


Abbildung 6: Messung der Aktivierung am Beispiel der Negativkontrolle und dem Allergenansatz bei den Populationen CCR3 (a)/(b), CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (c)/(d), CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> (e)/(f), CD203c (g)/(h), CD203c<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> (i)/(j) und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (k)/(l).

Die Auswertung des Flow CAST® erfolgte gemäß des Manuals der Firma Bülmann Laboratories AG (siehe Abbildung 7).<sup>19</sup>



**Abbildung 7:** Darstellung der Messungen durch den Flow CAST®: Setzen des Gates der basophilen Granulozyten (a). Messung der Aktivierung in der Negativkontrolle (b), Positivkontrolle 1 (c), Positivkontrolle 2 (d) und nach Allergenexposition (e).

Beim intrazellulären Histaminnachweis wurden die basophilen Granulozyten anhand der Oberflächenmarker IgE-FITC und CD203c-PE identifiziert. Dabei wurde zunächst in einem Punktdiagramm IgE zum Side Scatter korreliert und ein Auswertungsfenster auf die IgE positive Zellpopulation mit niedrigem SSC gelegt. Im Anschluss wurden diese Zellen in einem weiteren Dotplot mit CD203c in Bezug gesetzt und die CD203c positive Zellpopulation als basophile Granulozyten definiert. Der Aktivierungsnachweis erfolgte wie in den anderen Experimenten mit CD63. Die Identifizierung und Messung der Aktivierung sind in anhand eines Beispiels in Abbildung 8 verdeutlicht.

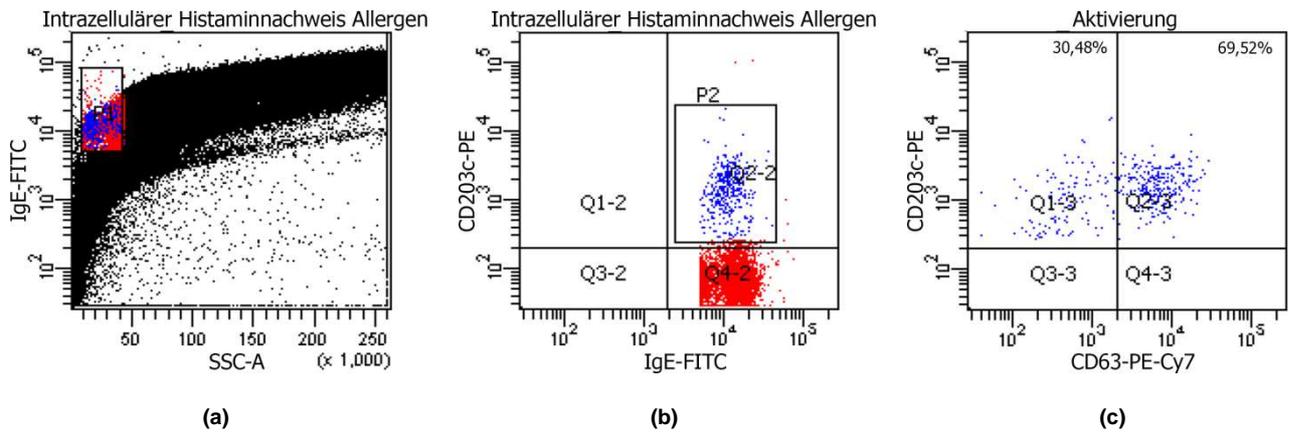
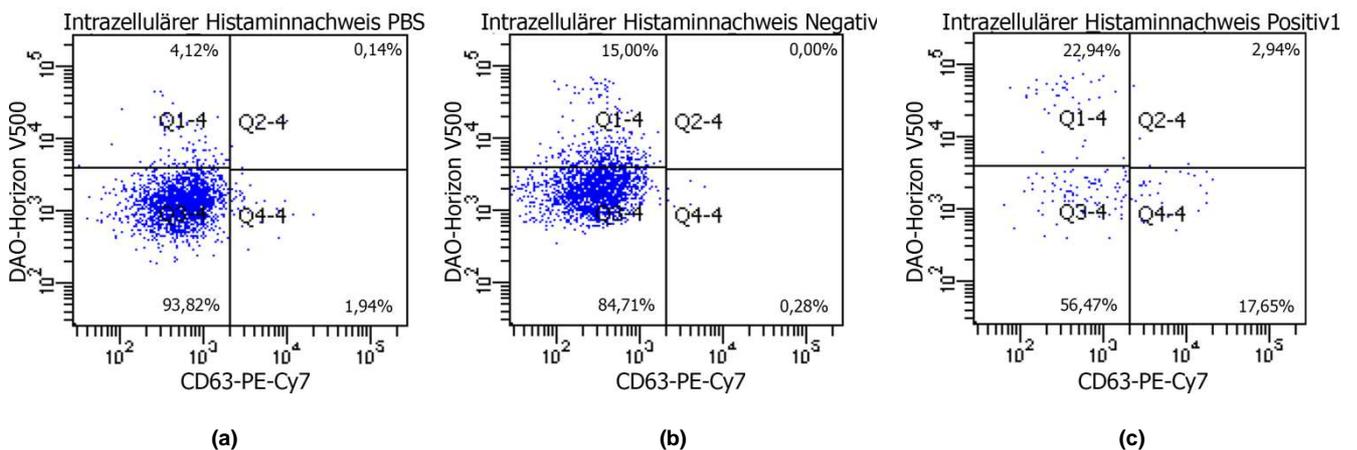


Abbildung 8: Identifizierung (a)-(b) und Messung der Aktivierung (c) beim intrazellulären Histaminnachweis am Beispiel der Allergenansatzes. Die Identifizierung erfolgt mittels IgE-FITC und CD203c-PE, als Aktivierungsmarker dient CD63-PE-Cy7.

Für die Analyse der Histaminfreisetzung wurden die basophilen Granulozyten in einem Dotplot den Parametern DAO (Y-Achse) und CD63 (X-Achse) zugeordnet, so dass sowohl die Zahl der Zellen mit intrazellulärer DAO-Markierung (und demnach intrazellulärem Histamin), als auch der Grad der Aktivierung beurteilt wurde und gleichzeitig beide Parameter zueinander in Bezug gesetzt werden konnten (siehe Abbildung 9). Der Cut-Off zwischen DAO positiv und DAO negativ wurde anhand des PBS-Kontrollansatzes (ohne Triton X) festgesetzt.



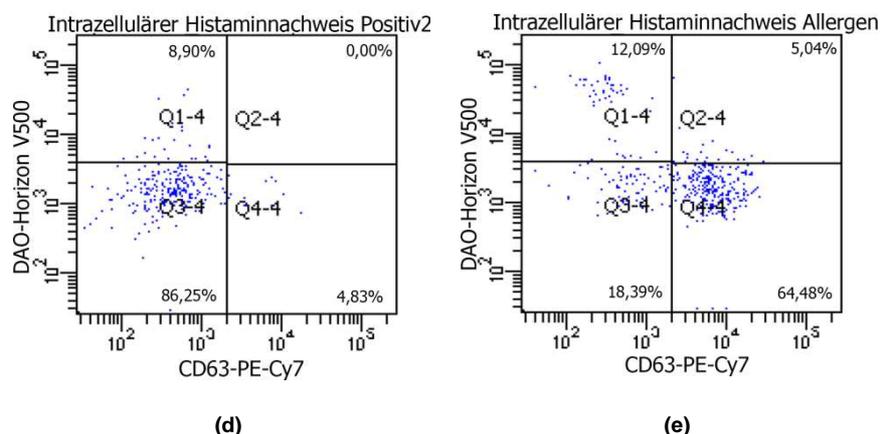


Abbildung 9: Dotplot für Diaminoxidase (entspricht intrazellulärem Histamin) und CD63 (Aktivierungsmarker) in der PBS-Kontrolle (a), Negativkontrolle (b), Positivkontrolle 1(c), Positivkontrolle 2 (d) und im Allergenansatz (e).

Die Analyse der Durchflusszytometrie wurde mit der Software FACS DIVA Version 7.5 durchgeführt. Dabei wurden sowohl absolute als auch, in Bezug auf die Gesamtzellzahl bzw. in Bezug auf das Basophilen-Gate in Prozent beschriebene, relative Zahlenwerte berechnet.

## 2.8 Statistische Methoden

Für die deskriptive Statistik der Parameter wurden Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung erstellt. Der Vergleich der Unterschiede zwischen den zellulären Markern zur Identifizierung der basophilen Granulozyten, der sich anschließenden Messung der Aktivierung sowie zwischen einzelnen Kontaminationsmessungen wurde anhand des t-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde dabei ein Alpha von 5 % gewählt. Für den Vergleich der Gemeinsamkeit der Identifizierungsmarker wurde eine Konkordanzanalyse nach Kendall berechnet. (Interpretation siehe Tabelle 8)

Tabelle 8 Interpretation der Konkordanzanalyse nach Kendall<sup>4</sup>

Kendall W	Interpretation
< 0	Keine Übereinstimmung
0,0 – 0,20	Schwache Übereinstimmung
0,21 – 0,40	Geringe Übereinstimmung
0,41 – 0,60	Mäßige Übereinstimmung
0,61 – 0,80	Gute Übereinstimmung
0,81 – 1,00	Sehr gute Übereinstimmung

Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplots und Bland-Altman-Diagrammen. Dabei wird im Bland-Altman-Diagramm die Differenz der einzelnen Messwerte-Paare gegen den Mittelwert der beiden Messungen aufgetragen, so dass die Streuung der Differenzen der einzelnen Messwerte-Paare deutlich wird und sowohl Ausreißer, als auch generelle Unterscheidungsmuster sichtbar werden. Die mittlere Linie beschreibt dabei den Mittelwert der Differenzen ( $d$ ) und die 2 äußeren Linien, welche auch als Übereinstimmungsgrenzen bezeichnet werden, die doppelte Standardabweichung von  $d$ .<sup>64</sup>

Für die statistische Auswertung wurden die Programme IBM SPSS Statistics 20 sowie Microsoft Office Excel 2007 genutzt. Sie erfolgte mit Unterstützung durch die unabhängige statistische Beratung Bernhard Ulm sowie durch das Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (Herr Bernhard Haller).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleich der zellulären Marker

#### 3.1.1 Identifikation der basophilen Granulozyten

Um die zellulären Marker anti-CCR3-Alexa Fluor 647, anti-IgE-FITC, anti-CRTH2-Horizon V450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5 und anti-CD203c-PE zu vergleichen, wurde der prozentuale Anteil der, für den entsprechenden Marker positiven, Zellen, an der Gesamtzellzahl dokumentiert. Dieser Wert sollte möglichst dem wahren anteiligen Wert der basophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl entsprechen. Neben den einzelnen Markern wurden auch die Kombinationen CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CRTH2<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> und IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> untersucht. Bei insgesamt sehr kleinen Zahlenwerten wurde als Einheit % x 10<sup>-3</sup> ± Standardabweichung (SA) gewählt. Die Patienten und Kontrollen wurden bei der Auswertung zusammengefasst.

Die Mediane der einzelnen untersuchten Parameter schwankten deutlich, wobei der höchste Median außer bei der Positivkontrolle 1 (anti-IgE-FITC mit 43,3 x 10<sup>-3</sup> %) immer bei anti-CCR3-Alexa Fluor 647 zu finden war (Negativkontrolle: 46,8 x 10<sup>-3</sup> %; Positivkontrolle 2: 56,5 x 10<sup>-3</sup> %; Allergen: 52 x 10<sup>-3</sup> %). Der niedrigste Median ergab sich bei allen 4 Ansätzen bei den CRTH2<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellen mit 16,12 x 10<sup>-3</sup> % für die Negativkontrolle, 9,39 x 10<sup>-3</sup> % für die Positivkontrolle 1, 26,81 x 10<sup>-3</sup> % für die Positivkontrolle 2 und 13,86 x 10<sup>-3</sup> % für den Ansatz mit Allergen.

Bei allen 4 Ansätzen (Negativkontrolle, Positivkontrolle 1 und 2, Allergen) zeigte sich insgesamt eine große Streuung der Einzelwerte aller Marker. Bei der Negativkontrolle hatte, nach Ausschluss der Ausreißer, die Kombination IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> den größten Streubereich (Minimum 2 x 10<sup>-3</sup> %, Maximum 104 x 10<sup>-3</sup> %). Bei der Positivkontrolle 1 und dem Allergen-Ansatz hingegen der Marker anti-CCR3-Alexa Fluor 647 (Positivkontrolle: Minimum 8 x 10<sup>-3</sup> %, Maximum 123,9 x 10<sup>-3</sup> %; Allergen: Minimum 5,8 x 10<sup>-3</sup> %, Maximum 111,1 x 10<sup>-3</sup> %) und bei der Positivkontrolle 2 die Kombination CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> (Minimum 8 x 10<sup>-3</sup> %, Maximum 95 x 10<sup>-3</sup> %).

Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 10 dargestellt.

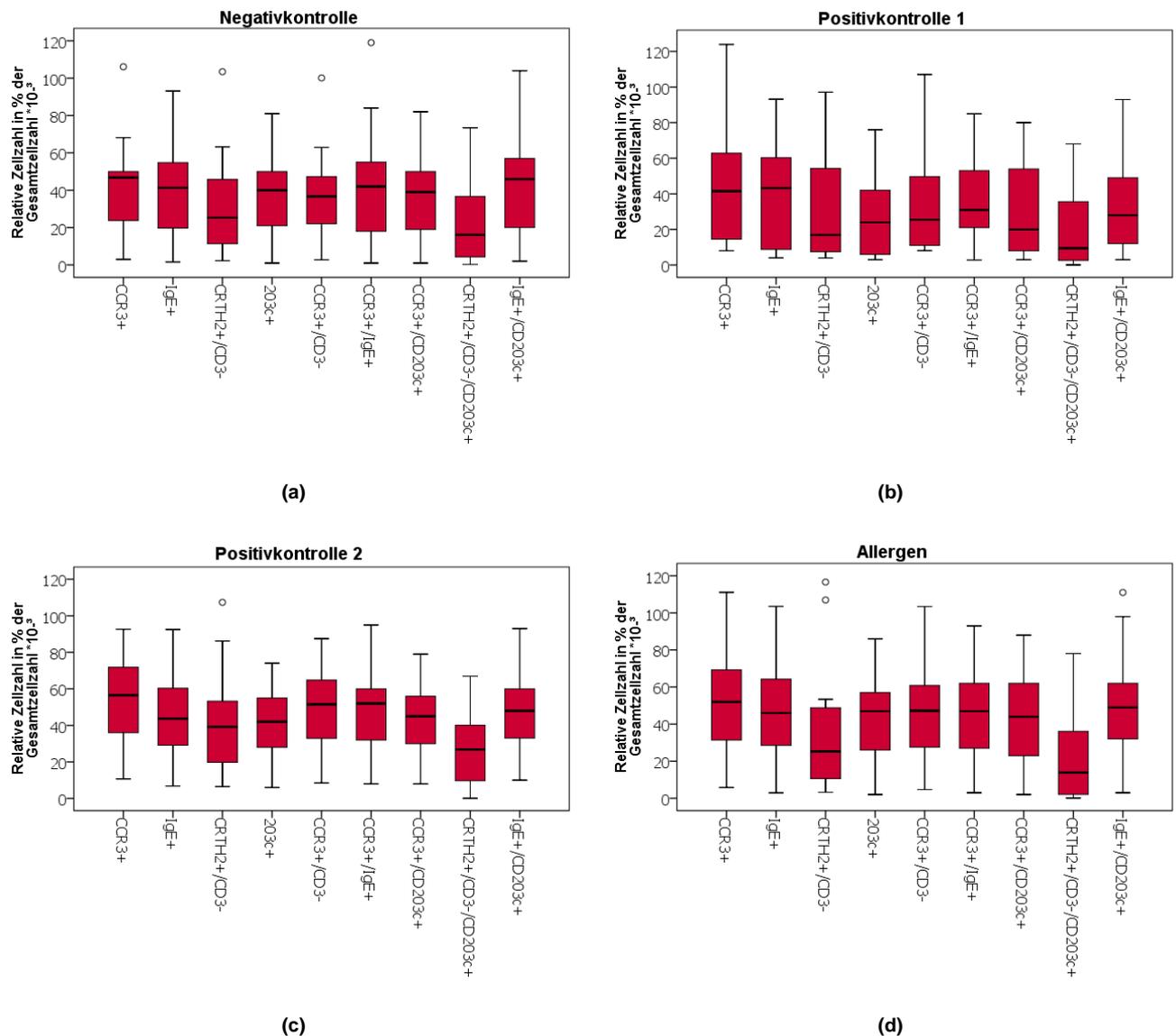


Abbildung 10: Relative Zellzahlen der basophilen Granulozyten in der Negativkontrolle (a), Positivkontrolle 1 (b), Positivkontrolle 2 (c) und im Allergenansatz (d): Dargestellt sind die Streubreite, drastische Ausreißer, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (mittlere 50 % der Werte) sowie der Median.

Bei dem Vergleich der Mittelwerte fiel auf, dass anti-CCR3-Alexa Fluor 647 in den beiden Positivkontrollen und im Allergenansatz den höchsten Mittelwert aller Marker aufwies (Positivkontrolle 1:  $45,3 \times 10^{-3} \% \pm 34,5 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 2:  $54,76 \times 10^{-3} \% \pm 25,2 \times 10^{-3} \%$ ; Allergen:  $53,1 \times 10^{-3} \% \pm 28,2 \times 10^{-3} \%$ ).

Bei der Negativkontrolle lag der höchste Mittelwert bei den IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen mit  $43,5 \times 10^{-3} \% \pm 32,5 \times 10^{-3} \%$ . Die zweithöchsten Mittelwerte ergaben sich für die Negativkontrolle dann bei anti-CCR3-Alexa Fluor 647 ( $41 \times 10^{-3} \% \pm 28,2 \times 10^{-3} \%$ ), für die Positivkontrolle 1 bei anti-IgE-FITC ( $38,3 \times 10^{-3} \% \pm 29,1 \times 10^{-3} \%$ ) und für die Positivkontrolle 2 und den

Allergen-Ansatz bei den IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen (Positivkontrolle 2:  $49,5 \times 10^{-3} \% \pm 24 \times 10^{-3} \%$ ; Allergen:  $50,6 \times 10^{-3} \% \pm 31,8 \times 10^{-3} \%$ ).

Die relativen Zellzahlen der Zellen mit CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> und CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> befanden sich im oberen Mittelfeld, dahinter folgten die CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>- (Negativkontrolle:  $34 \times 10^{-3} \% \pm 24,1 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 1:  $31,3 \times 10^{-3} \% \pm 25,1 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 2:  $41,8 \times 10^{-3} \% \pm 19,3 \times 10^{-3} \%$ ; Allergen:  $44,5 \times 10^{-3} \% \pm 26,7 \times 10^{-3} \%$ ) und CD203c<sup>+</sup>-Zellen (Negativkontrolle:  $34,5 \times 10^{-3} \% \pm 23,8 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 1:  $30,4 \times 10^{-3} \% \pm 23,7 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 2:  $41,1 \times 10^{-3} \% \pm 19,2 \times 10^{-3} \%$ ; Allergen:  $43,4 \times 10^{-3} \% \pm 24,4 \times 10^{-3} \%$ ).

Der niedrigste mittlere prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl wurde für alle 4 Ansätze bei den CRTH2<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellen gefunden.

Im Vergleich zu den zellulären Markern von BD und Sigma Aldrich, wurde die relative Anzahl der basophilen Granulozyten auch anhand des Flow CAST® mit dem Marker anti-CCR3-PE gemessen. Dabei zeigten alle 4 Ansätze im Vergleich zum Marker anti-CCR3-Alexa Fluor 647 im Mittel deutlich höhere Messwerte (Negativkontrolle:  $106,9 \times 10^{-3} \% \pm 234 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 1:  $132,6 \times 10^{-3} \% \pm 345 \times 10^{-3} \%$ ; Positivkontrolle 2:  $118,3 \times 10^{-3} \% \pm 321,1 \times 10^{-3} \%$ ; Allergen:  $100,2 \times 10^{-3} \% \pm 217,9 \times 10^{-3} \%$ ).

Bei dem kommerziell erhältlichen Basophilenaktivierungstest Flow CAST® erfolgte die Identifizierung der basophilen Granulozyten anhand des Markers anti-CCR3-PE. Da der Flow CAST® als standardisierte Kontrolle für alle Probanden durchgeführt wurde, wurde auch der CCR3-Antikörper von BD (anti-CCR3-Alexa Fluor 647) bei dem Vergleich der Identifizierungsmarker als Goldstandard festgelegt.

Zum Vergleich der Unterschiede zwischen dem Marker anti-CCR3 Marker und den anderen Markern bzw. Marker-Kombinationen wurde der t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse des t-Tests für verbundene Stichproben (signifikante p-Werte hervorgehoben) und der Konkordanzanalyse nach Kendall (\* signifikant unterschiedlicher Wert) im Vergleich von CCR3 und den übrigen Markern/Markerkombinationen

	Negativ		Positiv 1		Positiv 2		Allergen	
	Kendall W	p	Kendall W	p	Kendall W	p	Kendall W	p
IgE <sup>+</sup>	0,479*	0,385	0,479*	0,167	0,290	0,114	0,716*	0,235
CRTH2 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup>	0,053	0,101	0,716*	<b>0,006</b>	0,479*	<b>0,035</b>	0,716*	<b>0,040</b>
CD203c <sup>+</sup>	0,923*	<b>0,003</b>	1,000*	<b>0,001</b>	0,716*	<b>0,001</b>	0,479*	<b>0,001</b>
CCR3 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup>	1,000*	<b>0,001</b>	0,716*	<b>0,001</b>	1,000*	<b>&lt;0,001</b>	1,000*	<b>&lt;0,001</b>
CCR3 <sup>+</sup> /IgE <sup>+</sup>	0,290	0,906	0,716*	<b>0,016</b>	0,148	0,304	0,479*	<b>0,029</b>
CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>+</sup>	0,719*	<b>0,007</b>	1,000*	<b>0,001</b>	1,000*	<b>&lt;0,001</b>	0,410*	<b>0,010</b>
CRTH2 <sup>+</sup> /CD203c <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup>	1,000*	<b>0,001</b>	1,000*	<b>&lt;0,001</b>	1,000*	<b>&lt;0,001</b>	1,000*	<b>&lt;0,001</b>
IgE <sup>+</sup> /CD203c <sup>+</sup>	0,290	0,599	1,000*	<b>0,002</b>	0,006	0,054	0,290	0,324

Die mit anti-CCR3-Alexa Fluor 647 gemessenen relativen Zellzahlen waren in allen 4 Ansätzen signifikant höher als bei anti-CD203c-PE und den Kombinationen CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> und CRTH2<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>. Bei dem Vergleich von CCR3<sup>+</sup>-Zellen und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellen wurde lediglich bei der Negativkontrolle kein signifikanter Unterschied gefunden.

Die Kombination CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> hatte hingegen nur in der Positivkontrolle 1 und im Allergenansatz signifikant niedrigere Zellzahlen, IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> sogar nur in der Positivkontrolle 1. Bei der Testung von anti-CCR3-Alexa Fluor 647 zu anti-IgE-FITC ließ sich in keinem Ansatz ein signifikanter Unterschied zeigen.

Für den Vergleich der Gemeinsamkeit der Identifizierungsmarker wurde eine Konkordanzanalyse nach Kendall berechnet (siehe Tabelle 9). Dabei wurde bei allen 4 Ansätzen eine signifikante Messübereinstimmung bei dem Vergleich der CCR3<sup>+</sup>-Zellen mit den CD203c<sup>+</sup>-, CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-, CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>- und CRTH2<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>-</sup>-Zellen gefunden.

Im Vergleich der Zellzahlen der CCR3<sup>+</sup>-Zellen und IgE<sup>+</sup>-Zellen ergab sich nur für die Negativkontrolle, Positivkontrolle 1 und den Allergenansatz eine signifikante Messübereinstimmung, bei der Negativkontrolle (0,497) und Positivkontrolle 1 (0,497) war die Messübereinstimmung jedoch nur mäßig.

Im Vergleich von anti-CCR3-Alexa Fluor 647 mit anti-CRTH2-Horizon V450/anti-CD3-PerCP Cy5.5 zeigte sich bei der Negativkontrolle keine signifikante Messübereinstimmung (Kendall W 0,053), bei der Positivkontrolle 2 (Kendall W 0,479) war diese nur mäßig.

Verglich man die Zellzahlen der CCR3<sup>+</sup>-Zellen mit der denen der CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>-Zellen, so fiel eine signifikante Messübereinstimmung bei der Positivkontrolle 1 (Kendall W 0,761: gut) und dem Allergenansatz (Kendall W 0,479: mäßig) auf, die Negativkontrolle und Positivkontrolle 2 stimmten nicht signifikant überein.

Anti-IgE-FITC/anti-CD203c-PE hatte in Bezug zu anti-CCR3-Alexa Fluor 647<sup>+</sup> nur bei der Positivkontrolle 1 eine signifikante Messübereinstimmung (Kendall W 1).

Für die graphische Darstellung dieser Übereinstimmung der Messwerte, wurden Bland-Altman-Plots erstellt. Beispielhaft sind der Vergleich anti-CCR3<sup>+</sup> und anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup> als Marker mit der insgesamt niedrigsten, und anti-CCR3<sup>+</sup> und anti-CRTH2<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>-</sup> mit der insgesamt höchsten Konkordanz dargestellt (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12)

Bei dem Vergleich von anti-CCR3<sup>+</sup> mit anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup> (siehe Abbildung 11) zeigte sich in allen 4 Ansätzen ein drastischer Ausreißer, auch wenn die übrigen Werte in der Negativkontrolle sehr nah an dem Mittelwert der Differenzen lagen und auch in den 3 anderen Ansätzen die restlichen Werte im Bereich der Übereinstimmungsgrenzen zu finden waren. In der Negativkontrolle, der Positivkontrolle 1 und dem Allergenansatz waren die Werte von anti-CCR3<sup>+</sup> meistens größer als die von anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup>, bei der Positivkontrolle 2 war dies jedoch ausgeglichen.

Bei dem Vergleich von anti-CCR3<sup>+</sup> und anti-CRTH2<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>-</sup> (siehe Abbildung 12) lagen bei der Negativkontrolle und der Positivkontrolle 1 alle Wertepaare in den Übereinstimmungsgrenzen, bei dem Allergenansatz und der Positivkontrolle 2 gab es jeweils einen milden Ausreißer. Die Messwerte von anti-CCR3<sup>+</sup> waren in allen Ansätzen deutlich größer als die von anti-CRTH2<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>-</sup>.

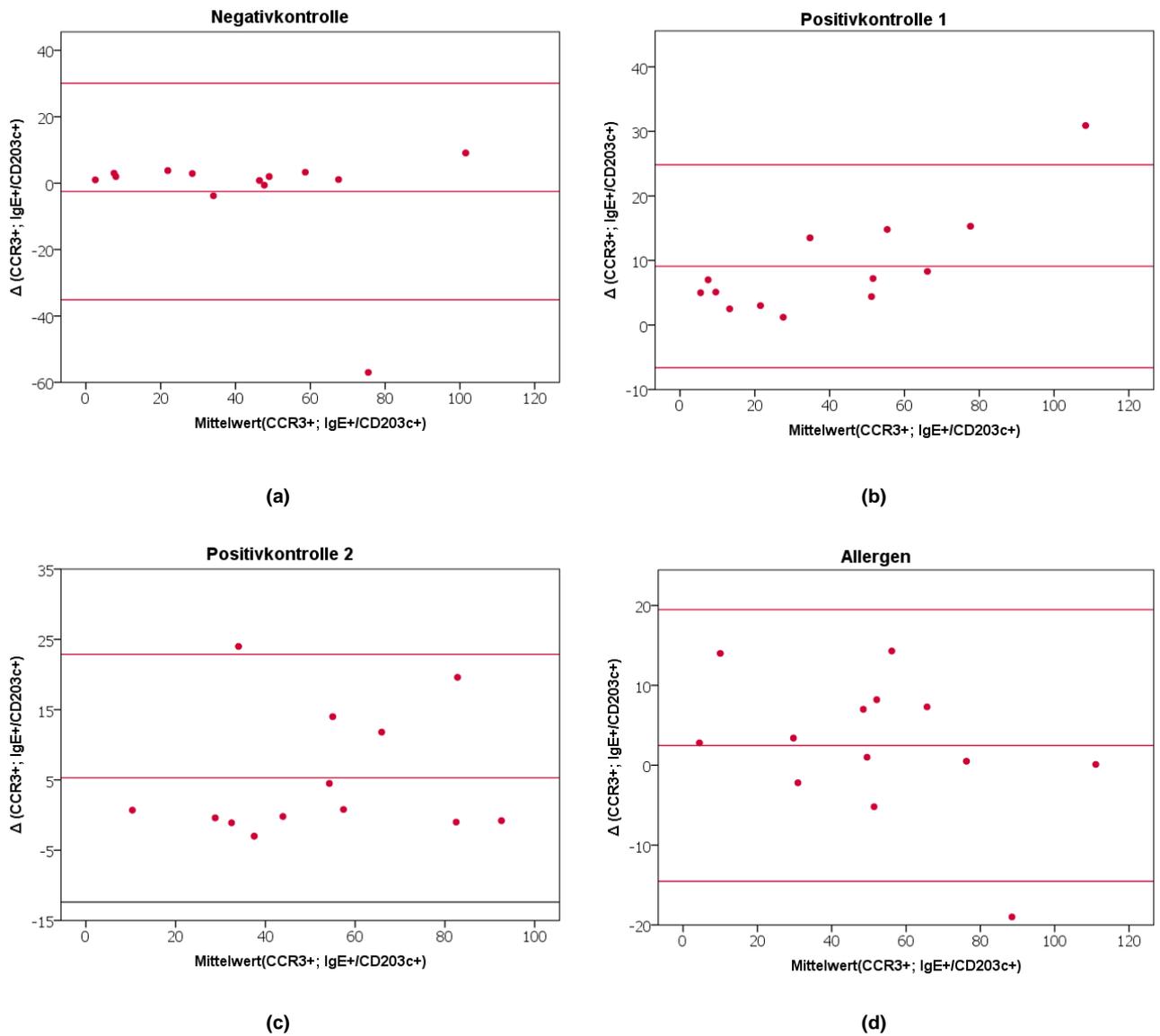


Abbildung 11: Bland-Altman-Diagramme von anti-CCR3<sup>+</sup> und anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup> der Negativkontrolle (a), Positivkontrolle 1 (b), Positivkontrolle 2 (c) und Allergenansatz (d): Darstellung der Differenz der Messwerte-Paare gegen den Mittelwert der Messwerte-Paare. Die Mittlere Linie entspricht dem Mittelwert der Differenzen d, die beiden äußeren Linien (Übereinstimmungsgrenzen) markieren die doppelte Standardabweichung von d.

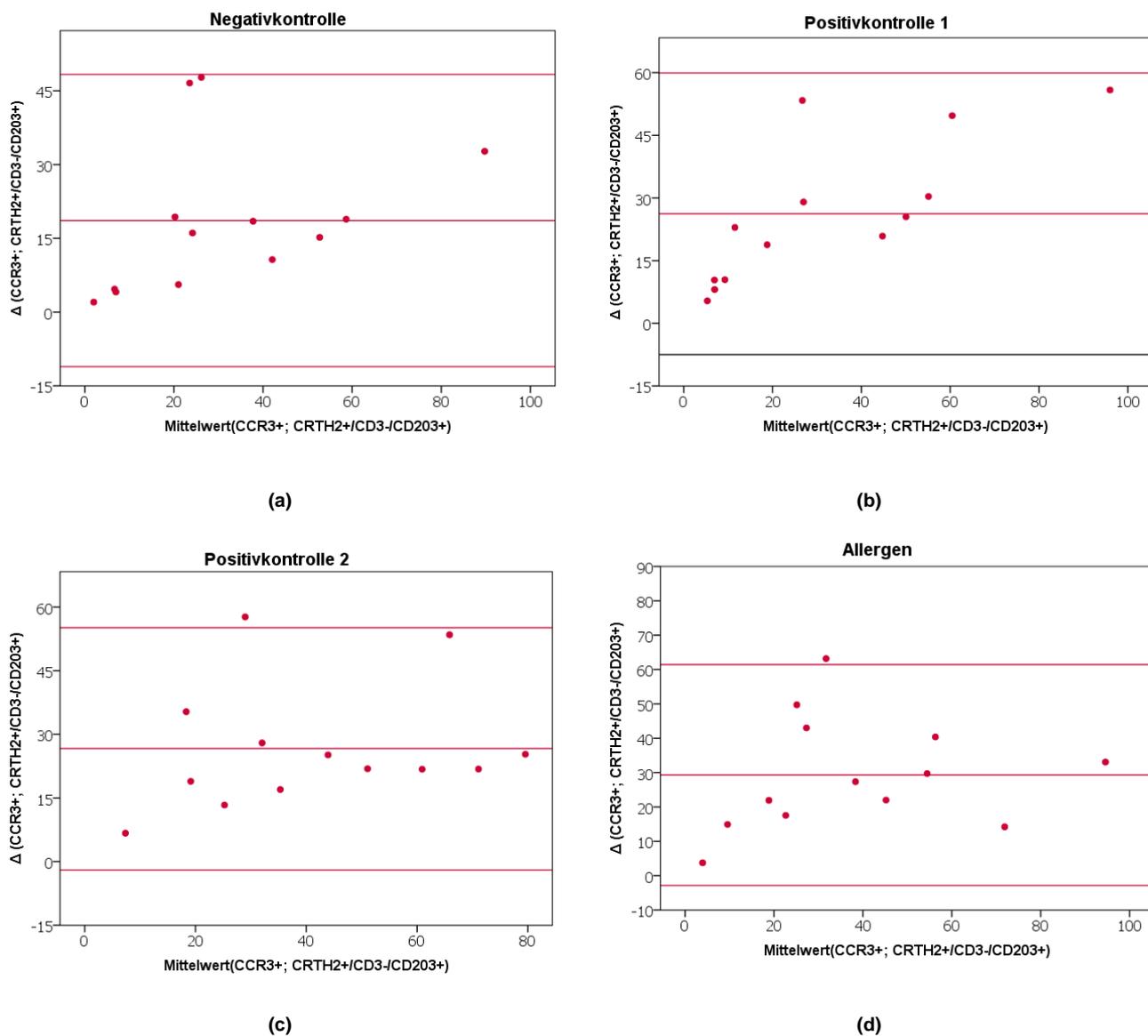


Abbildung 12: Bland-Altman-Diagramme von anti-CCR3<sup>+</sup> und anti-CRTH2<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>-</sup> der Negativkontrolle (a), Positivkontrolle 1 (b), Positivkontrolle 2 (c) und Allergenansatz (d): Darstellung der Differenz der Messwerte-Paare gegen den Mittelwert der Messwerte-Paare. Die Mittlere Linie entspricht dem Mittelwert der Differenzen d, die beiden äußeren Linien (Übereinstimmungsgrenzen) markieren die doppelte Standardabweichung von d.

### 3.1.2 Messung der Kontamination

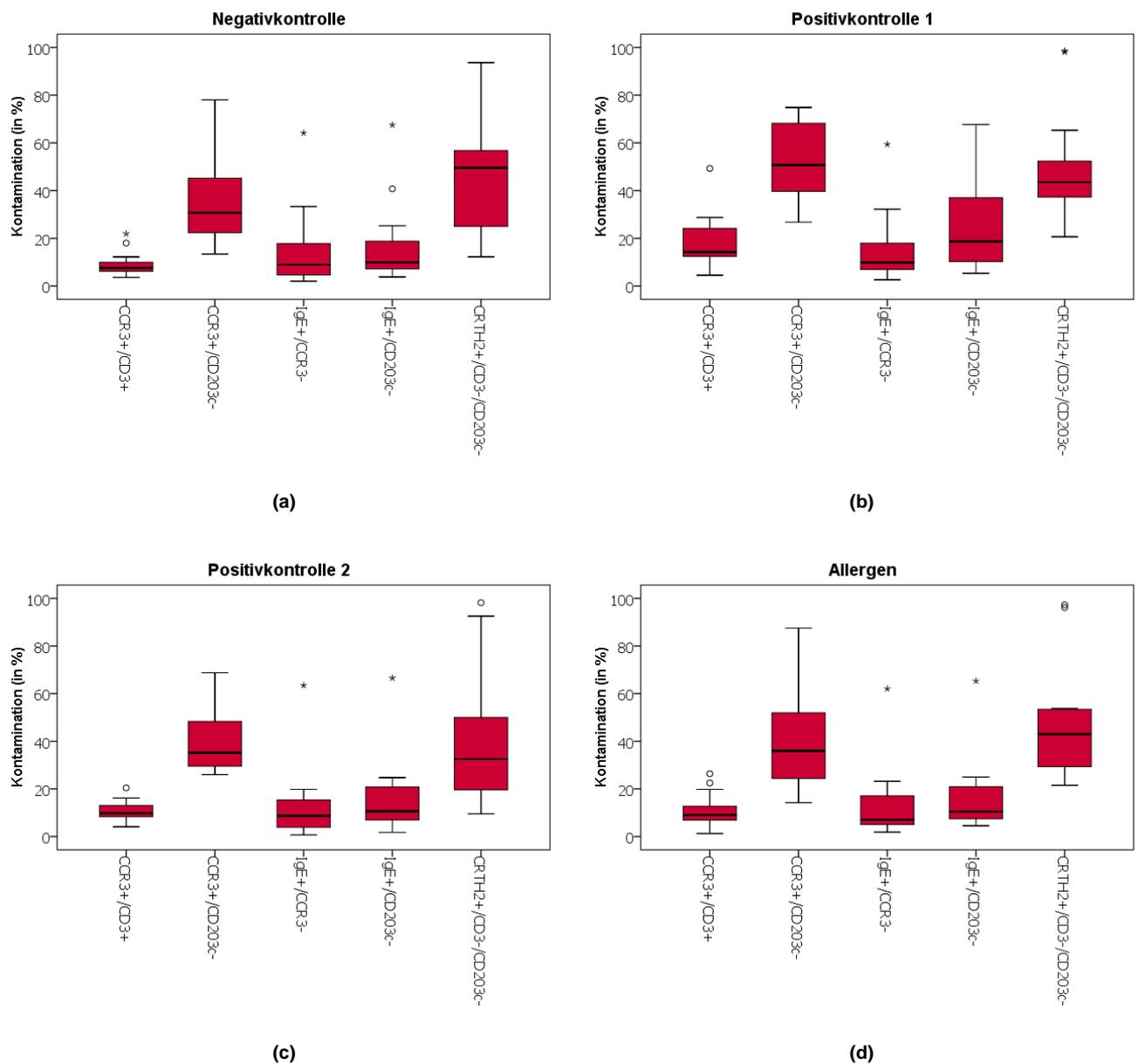
Die Kontamination der Zellpopulationen, die als mutmaßliche basophile Granulozyten identifiziert worden waren, mit Nichtbasophilen, wurde beispielhaft bei den Markern anti-CCR3, anti-IgE und anti-CRTH2/anti-CD3 näher beurteilt. Als Kontaminationmarker wurden dafür CD3<sup>+</sup>, CCR3<sup>-</sup>, und CD203c<sup>-</sup>-Zellen definiert. Statistisch untersucht und graphisch dargestellt wurde jeweils der prozentuale Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl der Zellpopulation ( $\pm$  SA), die wegen des Nachweises der Kontaminationsmarker keine Basophilen sein können. Es wurde in allen 4 Ansätzen nicht zwischen Patienten und Kontrollen unterschieden.

Verglich man die Mittelwerte der Messungen, so war die Kontamination der CCR3<sup>+</sup>-Population mit CD3<sup>+</sup>-Zellen bei allen Ansätzen außer der Positivkontrolle 1 insgesamt am niedrigsten (Negativkontrolle: 9,4 %  $\pm$  5,2 %; Positivkontrolle 1: 19,2 %  $\pm$  11,6 %; Positivkontrolle 2: 10,8 %  $\pm$  4,5 %; Allergen: 11,1 %  $\pm$  7,4 %), gefolgt von der Kontamination der IgE<sup>+</sup>-Population mit CCR3<sup>-</sup>-Zellen, wobei die Positivkontrolle 1 dort insgesamt den niedrigsten Mittelwert aller Kontaminationen in diesem Ansatz aufwies (Negativkontrolle 16 %  $\pm$  16,9 %; Positivkontrolle 1 15,9 %  $\pm$  15,4 %; Positivkontrolle 2 13,4 %  $\pm$  16,18 %; Allergen 13,8 %  $\pm$  16,1 %). Die anschließend niedrigste Kontamination war die der IgE<sup>+</sup>-Population mit CD203c<sup>-</sup>-Zellen (Negativkontrolle: 18,6 %  $\pm$  17,8 %; Positivkontrolle 1: 25,8 %  $\pm$  20,4 %; Positivkontrolle 2: 16,9 %  $\pm$  16,6 %; Allergen: 16,9 %  $\pm$  16,3 %).

Im Mittelfeld befand sich die Kontamination der CCR3<sup>+</sup>-Zellen mit CD203c<sup>-</sup>-Zellen (außer bei Positivkontrolle 1: höchste Kontaminationsrate) mit 36,1 %  $\pm$  17,8 % in der Negativkontrolle, 51,4 %  $\pm$  16,8 % in der Positivkontrolle1, 39,8 %  $\pm$  13,3 % in der Positivkontrolle 2 und 40,4 %  $\pm$  20,8 % im Allergenansatz.

Die höchsten Werte wurden, außer in der Positivkontrolle 1 (siehe oben), bei der Kontamination der CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Population mit CD203c<sup>-</sup>-Zellen verzeichnet (Negativkontrolle: 44,6 %  $\pm$  24,9 %; Positivkontrolle 1: 49,6 %  $\pm$  25%; Positivkontrolle 2: 40,56 %  $\pm$  28,2 %; Allergen: 47,5 %  $\pm$  24,4 %).

Graphisch wurden die Streubreite, Verteilung und Mediane der Messwerte der 4 verschiedenen Ansätze in einem Boxplot (siehe Abbildung 13) veranschaulicht.



**Abbildung 13:** Kontamination der Basophilen (definiert als CCR3<sup>+</sup>, IgE<sup>+</sup>, oder CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>), mit CD3<sup>-</sup>, CCR3<sup>-</sup>, und CD203c<sup>-</sup>-Zellen (in % des Hauptmarkers) in der Negativkontrolle (a), Positivkontrolle 1(b), Positivkontrolle 2 (c) und Allergenansatz (d). Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median.

In der Negativkontrolle hatte den die CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellen den geringsten Median (7,6 %), in den anderen 3 Ansätzen den, nach der IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> Kontamination, zweitkleinsten Median (Positivkontrolle 1: 14,3 %; Positivkontrolle 2: 9,8 %; Allergen:9 %). Die Mediane des prozentualen Anteils der IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup>-Zellen an der IgE<sup>+</sup>-Population in allen 4 Ansätzen waren etwas größer. Die höchsten Mediane wurden bei den CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD203c<sup>-</sup>-Zellen gemessen (Negativkontrolle: 49,6 %; Positivkontrolle 1: 43,5 %; Positivkontrolle 2: 32,5 %;

Allergen: 43 %). Es folgten die CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup>-Zellen (Negativkontrolle: 39 %; Positivkontrolle 1: 20 %; Positivkontrolle 2: 45 % Allergen:44 %). Die Streuung der Werte, unter Ausschluss der graphisch kenntlich gemachten Ausreißer, korrespondierte bei den kleinen Streubreiten in allen 4 Ansätzen mit den gering kontaminierten Markern, so dass eine geringe Streuung bei den CCR3<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>+</sup>-, IgE<sup>+</sup>/ CCR3<sup>-</sup>- und IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup>-Zellen zu finden war, wobei die große Streubreite von anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>-</sup> in der Positivkontrolle eine Ausnahme bildete. Die Streubreiten der übrigen Kontaminationen unterschieden sich deutlich in den verschiedenen Ansätzen, so dass kein wirkliches Muster auszumachen war.

Zum Vergleich der Unterschiede wurden die Kontaminationen mittels des t-Tests für verbundene Stichproben gegeneinander getestet (siehe Tabelle 10 ).

**Tabelle 10: Ergebnisse des t-Tests für verbundene Stichproben im Vergleich der Kontaminationsmarker CD3<sup>+</sup> und CD203c<sup>-</sup> in der Negativkontrolle, Positivkontrolle 1 und 2 sowie im Allergenansatz.**

Negativkontrolle	CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>	IgE <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>	Positivkontrolle 1	CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>	IgE <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>
CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>		p=0,001	CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>		p=0,001
CRTH2 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD203c <sup>-</sup>	p=0,253	p=0,006	CRTH2 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD203c <sup>-</sup>	p=0,825	p=0,025
CCR3 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>		p=0,091	CCR3 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>		p=0,365
Positivkontrolle 2			Allergen		
CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>		p<0,001	CCR3 <sup>+</sup> /CD203c <sup>-</sup>		p=0,001
CRTH2 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD203c <sup>-</sup>	p=0,924	p=0,019	CRTH2 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD203c <sup>-</sup>	p=0,347	p=0,003
CCR3 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>		p=0,235	CCR3 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>		p=0,295

Beim Vergleich der Kontaminationen mit CD203c<sup>-</sup>-Zellen in der CCR3<sup>+</sup>- und der IgE<sup>+</sup>-Population war die Kontamination bei den CCR3<sup>+</sup>-Zellen in allen 4 Ansätzen signifikant höher (Negativkontrolle, Positivkontrolle 1 und Allergen: p=0,01; Positiv 2: p<0,01).

Im Vergleich der CCR3<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>-</sup>-Zellen zu den CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD203c<sup>-</sup>-Zellen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

Dagegen war die Kontamination mit CD203c<sup>-</sup>-Zellen bei der IgE<sup>+</sup>-Population in allen 4 Ansätzen im Vergleich zu der der CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>- Population signifikant niedriger.

Ein abschließender Vergleich von dem prozentualen Anteil der CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen an der CCR3<sup>+</sup>-Zellpopulation mit dem Anteil von IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup>-Zellen an der IgE<sup>+</sup>-Population ergab in keinem Ansatz einen signifikanten Unterschied.

### 3.1.3 Messung der Aktivierung

Als Marker der basophilen Aktivierung wurde, wie in der Kontrollmessung mit dem Flow CAST®, CD63 genutzt. Im Flow CAST® war der CD63 Antikörper mit FITC konjugiert, für die Ansätze mit den verschiedenen Identifikationsmarkern wurde Anti-CD63–PE-Cy7 verwendet.

Ziel der statistischen Auswertung der Daten war zum einen ein Vergleich der Messung der Aktivierung durch den Flow CAST® mit der Kombination der Firma BD, zum anderen der Vergleich der Aktivierung bei den übrigen Kombinationen mit der bei anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD63-PE-Cy7 von BD. Dabei wurde zwischen Patienten und Kontrollgruppe unterschieden.

Die Aktivierung wurde als prozentualer Anteil der CD63 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der Basophilen ( $\pm$  SA) angegeben.

Die Mittelwertanalyse der deskriptiven statistischen Auswertung bei der Patientengruppe ergab für die Negativkontrolle des Flow CAST® eine mittlere Aktivierung von 3,4 %  $\pm$  2,6 %. Bei keinem der anderen Marker von BD und Sigma Aldrich lag die Aktivierung unter 5 %, bei der CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellpopulation lag sie mit 8,7 %  $\pm$  12,7 % jedoch unter 10 %, bei den CCR3<sup>+</sup>-Zellen und der CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Population unter 15 %. Den höchsten Mittelwert hatte die Kombination IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> mit 35,8 %  $\pm$  24,7 %.

Bei der Kontrollgruppe ergab sich für die Negativkontrolle des Flow CAST® eine mittlere Aktivierung von 3,5 %  $\pm$  1,5 %. Bei der CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellpopulation (4,5 %  $\pm$  1,1 %) lag die Aktivierung unter 5 %, bei den IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>-, CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-, CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>- und CD203c<sup>+</sup>-Zellen lag sie unter 10 %, bei anti-CCR3-Alexa Fluor 647 gelabelten Zellen unter 15 %. Den höchsten Mittelwert hatte auch bei den Kontrollen die Kombination IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> mit 30,5 %  $\pm$  34,8 %.

Der Boxplot der Negativkontrolle zeigt zudem, dass bei allen Markern teilweise extreme Ausreißer in den Messwerten vorlagen (siehe Abbildung 14). Die Mediane der Aktivierung waren dementsprechend deutlich kleiner als die Mittelwerte und lagen bei CCR3<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> unter 10 %.

Die Streubreite war, nach Ausschluss der gekennzeichneten Ausreißer, bei allen Markern in der Patientengruppe ähnlich, die geringste Streuung lag beim Flow CAST® vor (Minimum 0,94 %, Maximum 7,46 %).

In der Kontrollgruppe fiel bei IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> (Minimum 7,1 % Maximum 70,5 %) eine große Streubreite auf.

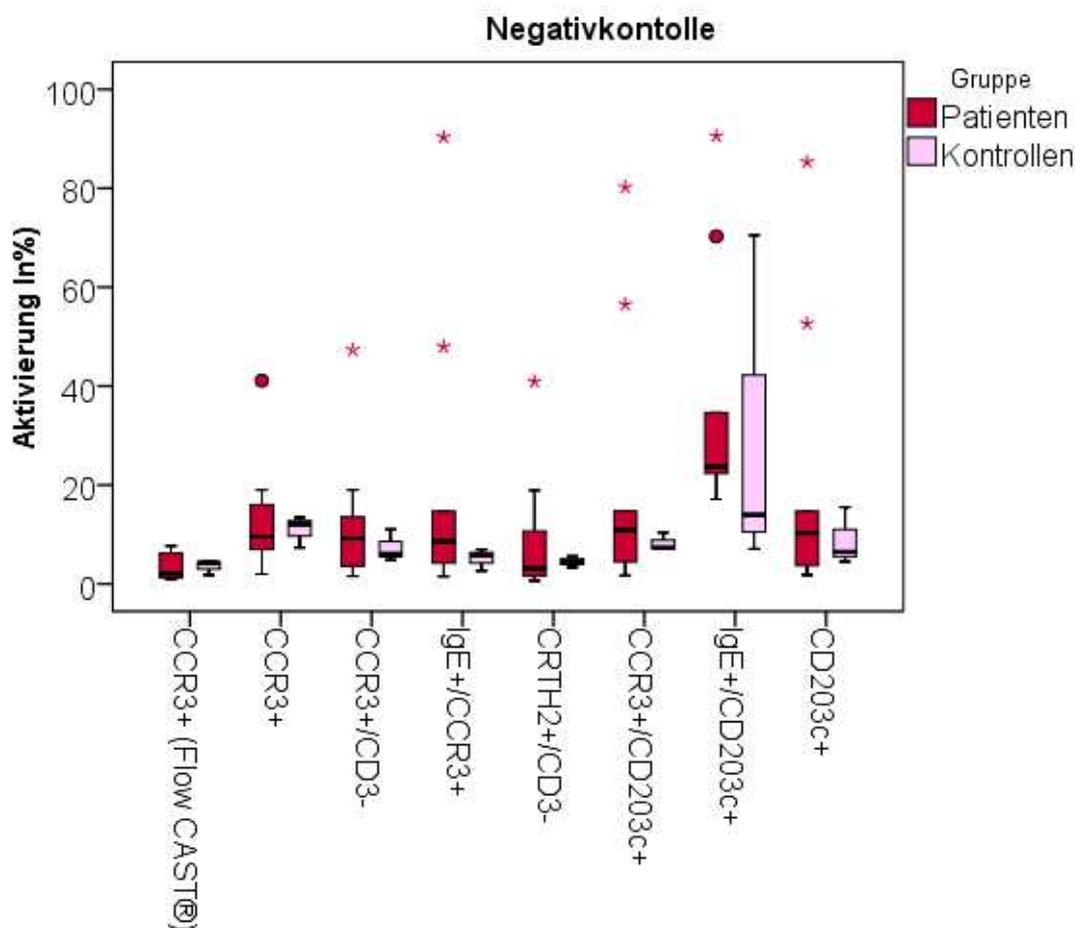


Abbildung 14: Aktivierung in % der CD63 positiven Zellen an der mittels verschiedener Marker ermittelten Gesamtzellzahl in der Negativkontrolle. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median.

Bei der Positivkontrolle 1 war mit dem Flow CAST® bei Patienten und Kontrollen eine deutliche Aktivierung von im Mittel  $75,8\% \pm 11,2\%$  bzw.  $79,1\% \pm 24,4\%$  gemessen worden.

Die Aktivierung bei den restlichen Markern war deutlich geringer. So lag der höchste Mittelwert bei den Patienten bei  $62,6\% \pm 14,7\%$  für das Protokoll, das mit IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen arbeitete. Zudem ergab sich, auch bei den Kontrollen, nur noch für die CD203c<sup>+</sup>- und die CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellpopulation eine Aktivierung über 50 %.

Die niedrigste Aktivierung wurde in der Patientengruppe mit im Mittel  $26,3\% \pm 18,2\%$  bei den CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellen gemessen.

Die Abbildung 15 zeigt den Überblick über die Streubreite, Verteilung und Mediane der Positivkontrolle 1. Die Streuung war, insbesondere in der Kontrollgruppe, insgesamt deutlich höher als bei der Negativkontrolle. Die niedrigste Streubreite lag bei den Patienten beim Flow CAST® vor (Minimum 58,4 %; Maximum 90,3 %). Bei den Kontrollen lag die

Streubreite des Flow CAST® (Minimum 51,2 % Maximum 96,4 %) knapp hinter der der CTRH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Population.

Die Kontrollgruppe hatte bei allen anderen Markern eine höhere Streubreite als die Gruppe der Patienten. Die Mediane der Patienten waren annähernd kongruent mit den Mittelwerten, bei den Kontrollen divergierten die beiden Werte entsprechend stärker.

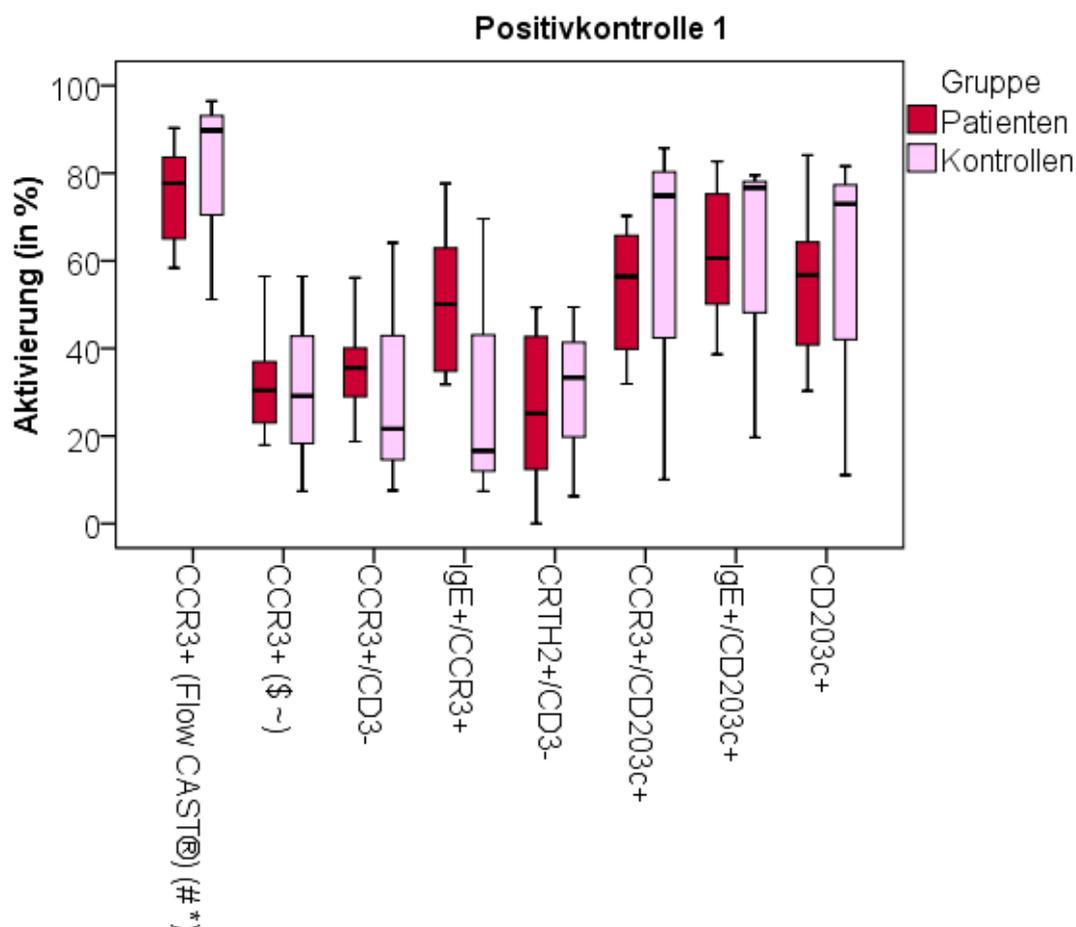


Abbildung 15: Aktivierung in % der CD63 positiven Zellen an der mittels verschiedener Marker ermittelten Gesamtzellzahl in der Positivkontrolle 1. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median. \* und ~ = signifikanter Unterschied bei Patienten, # und \$ = signifikanter Unterschied bei Kontrollen.

Die Analyse der Positivkontrolle 2 zeigte hingegen eine deutlich geringere Aktivierung als in der Positivkontrolle 1 (siehe Abbildung 16).

In der Patientengruppe lag die höchste Aktivierung bei der Markerkombination IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> bei im Mittel 40,9 % ±20,3 %, gefolgt von CD203c<sup>+</sup> und CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, die jeweils eine mittlere Aktivierung von über 30 % hatten. Mit dem Flow CAST® wurde lediglich eine Aktivierung von

20,4 % ± 12,7 % gemessen, die niedrigste Aktivierungsrate ließ sich jedoch bei den CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CC203c<sup>+</sup>-Zellen mit im Mittel 14,7 % ± 16,3 %.

Bei der Kontrollgruppe lag die höchste Aktivierung bei 29,5 % ± 18,5 % für die Kombination CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>, die Aktivierung beim Flow CAST® betrug 25,5 % ± 29,3 %. Die Streubreiten der verschiedenen Marker beider Gruppen variierten stark, in der Patientengruppe waren bei vielen Markern Ausreißer zu verzeichnen.

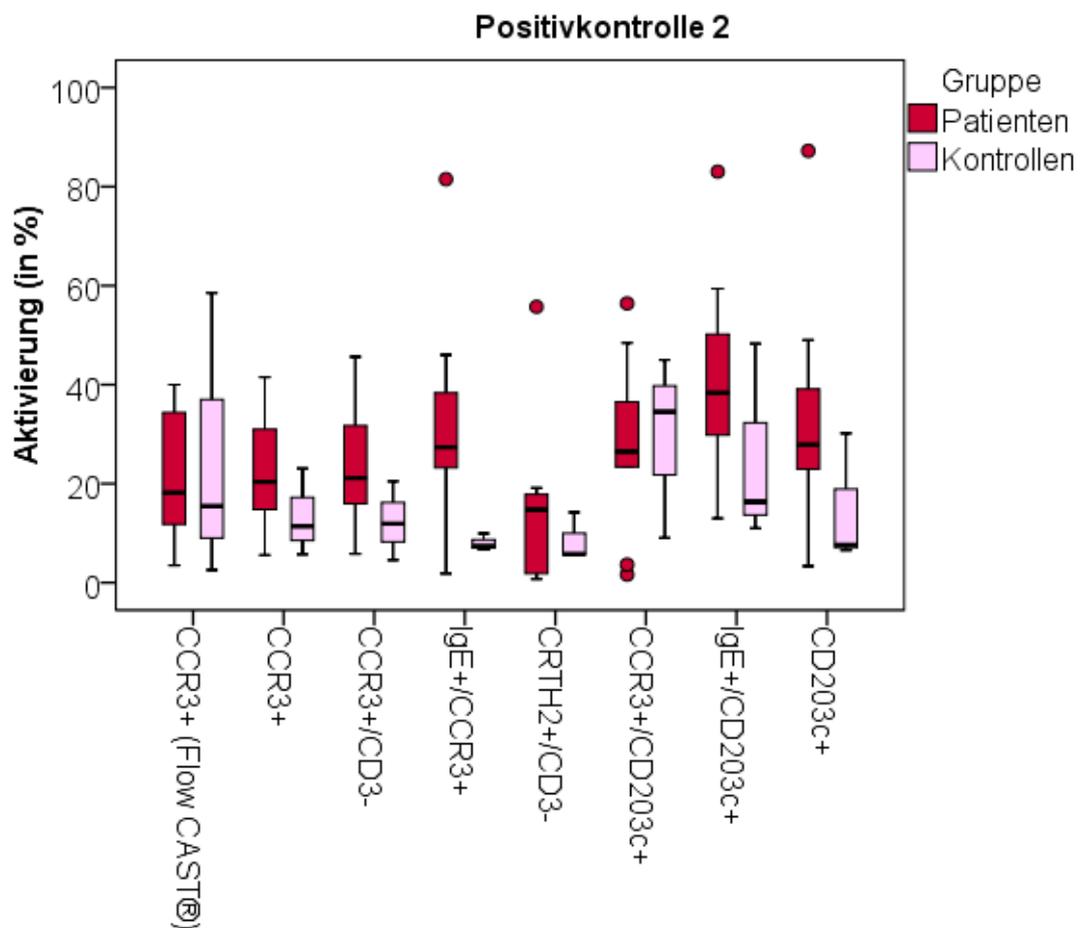


Abbildung 16: Aktivierung in % der CD63 positiven Zellen an der mittels verschiedener Marker ermittelten Gesamtzellzahl in der Positivkontrolle 2. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median.

Bei der Aktivierung durch das Gräserallergen war ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zu erkennen (siehe Abbildung 17).

Die höchste mittlere Aktivierung in der Patientengruppe wurde mit dem Flow CAST® gemessen (88,6 % ± 8,3 %, Median 92,3 %), gefolgt von dem Protokoll, das mit IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen arbeitete (69,7 % ± 13,53 %; Median 70,8 %). Auch die Aktivierungsrate der CD203c<sup>-</sup>, CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>-</sup>, und der CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellpopulation lag im Mittel über 60 %.

Die niedrigste mittlere Aktivierung wurde bei den mit CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> gelabelten Zellen mit 33,2 % ± 19,2 % (Median 34,8 %) gemessen. Die Streubreiten waren erneut bei allen Markern groß (kleinste Streubreite beim Flow CAST® mit Minimum 75,3 % und Maximum 99,5 %), die Mediane korrespondierten dabei stark mit den Mittelwerten.

In der Kontrollgruppe zeigte sich die niedrigste mittlere Aktivierung bei der Markerkombination CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> mit 1,31 % ± 0,6 % (Median 1,34 %). Die nächsthöheren Aktivierungsraten (unter 5 %) waren bei den CCR3/CD3<sup>-</sup>, CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>- und CD203<sup>+</sup>-Zellen zu verzeichnen. Nur bei der Kombination IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> wurde die Aktivierung mit über 10 % (16,2 % ± 10,3 %, Median 10,5 %) gemessen. Der Flow CAST® ergab eine Aktivierung von 5,7 % ± 4,23 % (Median 5,9 %). Die Streubreite war in der Kontrollgruppe insgesamt gering, die höchste Streuung zeigte sich bei den IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen (Minimum 10 %, Maximum 28 %).

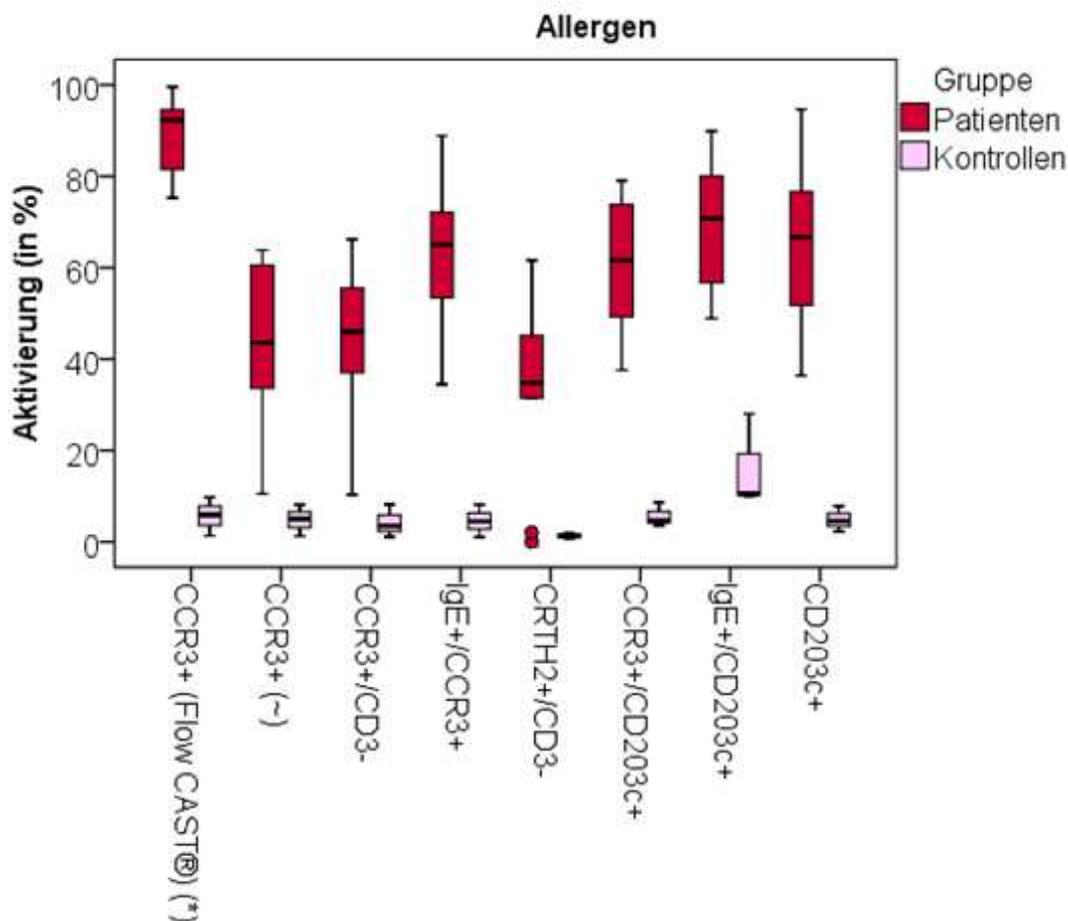


Abbildung 17: Aktivierung in % der CD63 positiven Zellen an der mittels verschiedener Marker ermittelten Gesamtzellzahl nach Allergenexposition. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median. . \* und ~ = signifikanter Unterschied bei Patienten.

Der Vergleich der Unterschiede zwischen der beim Flow CAST® und bei anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD63-PE-Cy7 der Firma BD gemessenen Aktivierung, wurde mittels t-Test für verbundene Stichproben angestellt.

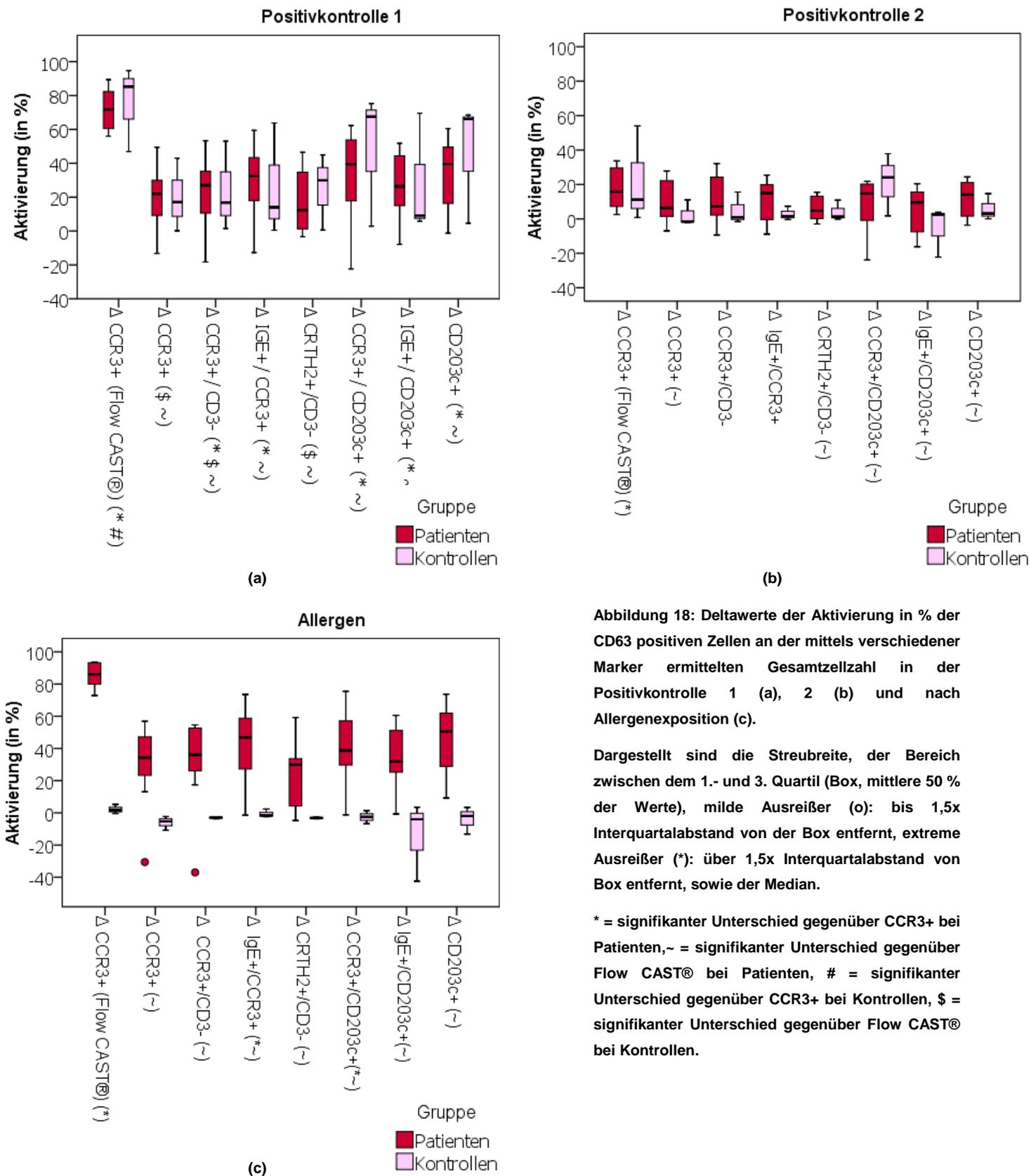
Dabei war die basophile Aktivierung der Patientengruppe beim Flow CAST® in der Positivkontrolle 1 und im Allergenansatz signifikant höher als bei der Kombination von BD ( $p < 0,001$ ). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich dies signifikant nur in der Positivkontrolle 1.

Da die Aktivierung bei der Kombination der verschiedenen zellulären Markern mit CD63 in den meisten Fällen unter 50 % lag, aber dennoch im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutliche Aktivierung der basophilen Granulozyten erfolgte, wurde die Differenz Delta zwischen der Aktivierung in den Positivkontrollen bzw. im Allergenansatz und der Negativkontrolle berechnet (siehe Abbildung 18)

Auch bei den Deltawerten zeigten sich in der Positivkontrolle 1 und im Allergenansatz bei den Patienten im Mittel die höchsten Werte der Aktivierung bei dem Marker anti-CD203c-PE (Positivkontrolle 1: 35,3 %  $\pm$  20,9 %; Allergen: 45,2 %  $\pm$  20,6 %). Darunter lagen die Aktivierungsraten der Populationen CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1: 33,4 %  $\pm$  26,7 %; Allergen: 40,8 %  $\pm$  22,7 %), und IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1: 30,1 %  $\pm$  21,8 %; Allergen: 43,5 %  $\pm$  22,2 %). Bei den CCR3<sup>+</sup>-Zellen war der Deltawert für die Positivkontrolle 1 19,1 %  $\pm$  18 % und für den Allergenansatz 30,3 %  $\pm$  25,6 %.

Bei den Kontrollen wurde der höchste Delta-Wert in der Positivkontrolle ebenfalls im Flow CAST® mit 75,6 %  $\pm$  25,3 % ermittelt, dahinter lagen die Zellpopulationen CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> (48,6 %  $\pm$  39,8 %), CD203c<sup>+</sup> (46,4 %  $\pm$  36,3 %) und IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> (28,1 %  $\pm$  36 %). Die CCR3<sup>+</sup>-Zellen hatten einen Delta-Wert von 20,1 %  $\pm$  21,6 %. Im Allergenansatz waren die Deltawerte bis auf den Flow CAST® (2,15 %  $\pm$  2,9 %) negativ.

In der Positivkontrolle 2 lagen die Delta-Werte der Aktivierung in Patienten- und Kontrollgruppe bei allen Markern, außer beim Flow CAST® (22 %  $\pm$  28,2 %) und bei den CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen (21,3 %  $\pm$  18,2 %) der Kontrollen unter 20 %. Bei den Patienten ließ sich der höchste Wert im Flow CAST® mit 17,1 %  $\pm$  11,8 % verzeichnen.



**Abbildung 18: Deltawerte der Aktivierung in % der CD63 positiven Zellen an der mittels verschiedener Marker ermittelten Gesamtzellzahl in der Positivkontrolle 1 (a), 2 (b) und nach Allergenexposition (c).**

Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median.

\* = signifikanter Unterschied gegenüber CCR3+ bei Patienten, ~ = signifikanter Unterschied gegenüber Flow CAST® bei Patienten, # = signifikanter Unterschied gegenüber CCR3+ bei Kontrollen, \$ = signifikanter Unterschied gegenüber Flow CAST® bei Kontrollen.

Im Vergleich der Unterschiede der Delta-Werte mittels t-Test für verbundene Stichproben waren bei den Positivkontrollen und dem Allergenansatz die Werte der Aktivierung des Flow CAST® in der Patientengruppe signifikant höher als die der CCR3<sup>+</sup>- (Positivkontrolle 1:  $p < 0,01$ ; Positivkontrolle 2:  $p = 0,027$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ), CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (Positivkontrolle 1:  $p < 0,01$ ; Positivkontrolle 2:  $p = 0,025$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ), CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>- (Positivkontrolle 1:  $p = 0,002$ ; Positivkontrolle 2:  $p = 0,048$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ), und IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen (Positivkontrolle 1:  $p < 0,01$ ; Positivkontrolle 2:  $p = 0,003$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ).

Nur in der Positivkontrolle 1 und dem Allergenansatz, aber nicht in der Positivkontrolle 2, ergab sich dieser Unterschied zum Flow CAST® bei den Patienten, der signifikant bei der Zellpopulation CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (Positivkontrolle 1:  $p < 0,01$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ), IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1:  $p < 0,01$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ) und CD203c<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1:  $p = 0,01$ ; Allergen:  $p < 0,01$ ) war.

In der Kontrollgruppe zeigten lediglich die Marker anti-CCR3-Alexa Fluor 647 ( $p = 0,013$ ), anti-CCR3/anti-CD3-PerCP-Cy5.5 ( $p = 0,025$ ) und anti-CRTH2-Horizon 450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5 ( $p = 0,003$ ) und jeweils nur in der Positivkontrolle 1 eine signifikant niedrigere Aktivierung als im Flow CAST®.

Anschließend wurde der Deltawert der Kombination anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD63-PE-Cy7 von BD, die ja der Markerkombination des Flow CAST® (anti-CCR3-PE/anti-CD63-FITC) entspricht und deshalb als Referenz gewählt wurde, gegen die Deltawerte der übrigen Kombinationen getestet.

Dabei zeigte sich, dass in der Patientengruppe bei den Populationen IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1:  $p = 0,001$ ; Allergen:  $p = 0,001$ ), CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1:  $p = 0,006$ ; Allergen:  $p = 0,012$ ) und CD203c<sup>+</sup> (Positivkontrolle 1:  $p < 0,01$ ; Allergen:  $p = 0,005$ ) sowohl in der Positivkontrolle 1 als auch im Allergen-Ansatz eine signifikant höhere Aktivierung als bei den CCR3<sup>+</sup>-Zellen gemessen wurde. Bei den Zellpopulationen CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> ( $p = 0,042$ ) und IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> ( $p = 0,009$ ) zeigte sich dies lediglich in der Positivkontrolle 1.

In der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

### 3.2 Intrazellulärer Nachweis von Histamin

Bei der Etablierung des HistaFlow wurden 5 Ansätze untersucht: Die PBS-Kontrolle (ohne Triton, d.h. keine Zellpermeabilisierung bzw. keine indirekte intrazelluläre Färbung des

Histamin durch Fluorochrom-konjugierte Diaminoxidase), die Negativkontrolle, die 2 Positivkontrollen und der Allergen-Ansatz. Dabei wurden die Zellzahl der identifizierten basophilen Granulozyten, deren Aktivierung und der intrazelluläre Nachweis der Diaminoxidase als indirekte Messung des Histamins in Bezug auf den Aktivierungszustand der Zellen analysiert.

### 3.2.1 Relative Zellzahl der basophilen Granulozyten

Abbildung 19 gibt einen Überblick über die relativen Zellzahlen (prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl  $\% \times 10^{-3} \pm SA$ ) der, als basophile Granulozyten charakterisierten, anti-CD203c-PE/anti-IgE-FITC positiven Zellen aller 5 Ansätze.

Dabei fallen große Unterschiede zwischen den 5 Ansätzen auf, die mit einer großen Streubreite und teilweise extremen Ausreißern in den Messwerten einhergehen.

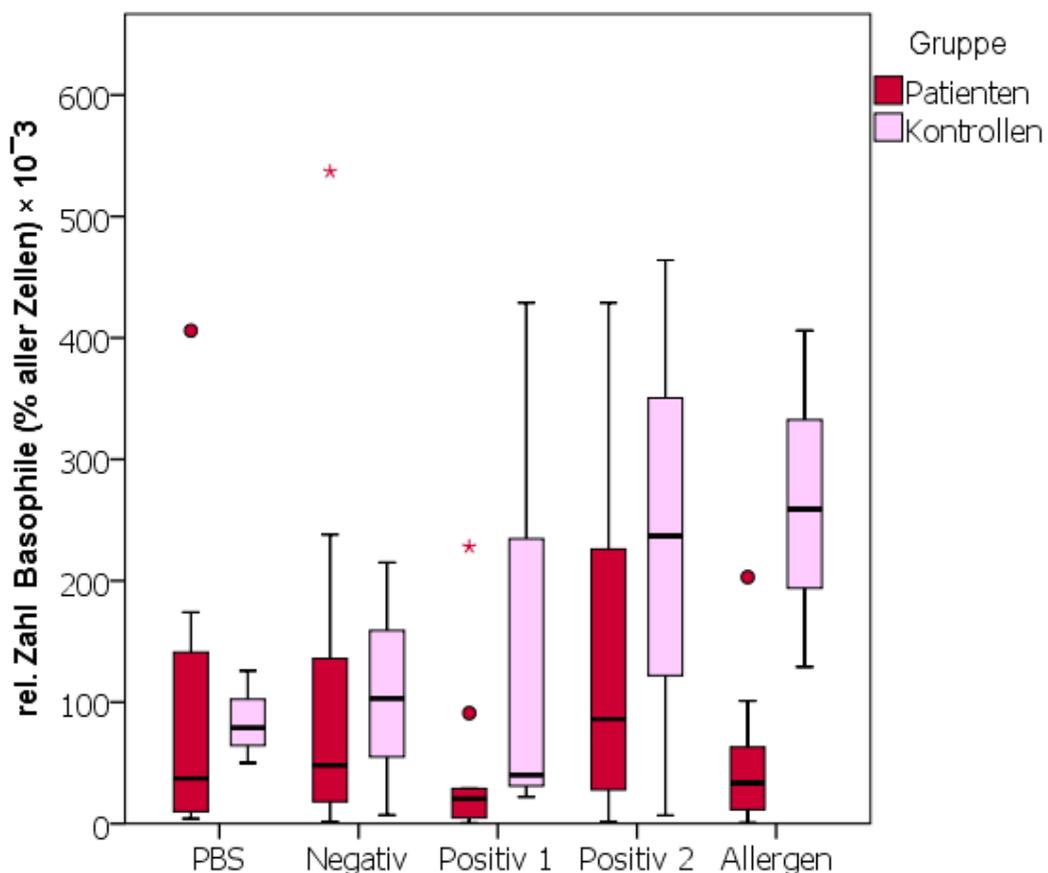


Abbildung 19: HistaFlow: Relative Zellzahlen der basophilen Granulozyten der PBS-Kontrolle, Negativkontrolle, Positivkontrolle 1, Positivkontrolle 2 und des Allergenansatzes. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median.

Die höchste mittlere Anzahl an Basophilen wurde bei der Patientengruppe in der Positivkontrolle 2 gemessen ( $136,2 \times 10^{-3} \% \pm 142,6 \times 10^{-3} \%$ ; Median  $86 \times 10^{-3} \%$ ). Es folgte die Negativkontrolle mit  $116,3 \times 10^{-3} \% \pm 164,8 \times 10^{-3} \%$  (Median  $48 \times 10^{-3} \%$ ) und die PBS-Kontrolle mit  $88,7 \times 10^{-3} \% \pm 126 \times 10^{-3} \%$  (Median  $37,1 \times 10^{-3} \%$ ). Deutlich niedrigere Werte waren im Allergenansatz ( $52,8 \times 10^{-3} \% \pm 61,1 \times 10^{-3} \%$ ; Median  $33,5 \times 10^{-3} \%$ ) und in der Positivkontrolle 1 ( $43,2 \times 10^{-3} \% \pm 70,2 \times 10^{-3} \%$ ; Median  $20,5 \times 10^{-3} \%$ ) zu verzeichnen.

Bei der Kontrollgruppe wurde die höchste mittlere Anzahl an Basophilen im Allergenansatz gemessen ( $264,7 \times 10^{-3} \% \pm 138,6 \times 10^{-3} \%$ ; Median  $259 \times 10^{-3} \%$ ). Es folgt die Positivkontrolle 2 mit  $236 \times 10^{-3} \% \pm 228,6 \times 10^{-3} \%$  (Median  $237 \times 10^{-3} \%$ ) und die Positivkontrolle 1 mit  $163,7 \times 10^{-3} \% \pm 230 \times 10^{-3} \%$  (Median  $40 \times 10^{-3} \%$ ). In der Negativkontrolle ( $108,3 \times 10^{-3} \% \pm 104,1 \times 10^{-3} \%$ ; Median  $103 \times 10^{-3} \%$ ) und im PBS-Ansatz ( $85 \times 10^{-3} \% \pm 38,4 \times 10^{-3} \%$ ; Median  $79 \times 10^{-3} \%$ ) war die Anzahl der Basophilen geringer.

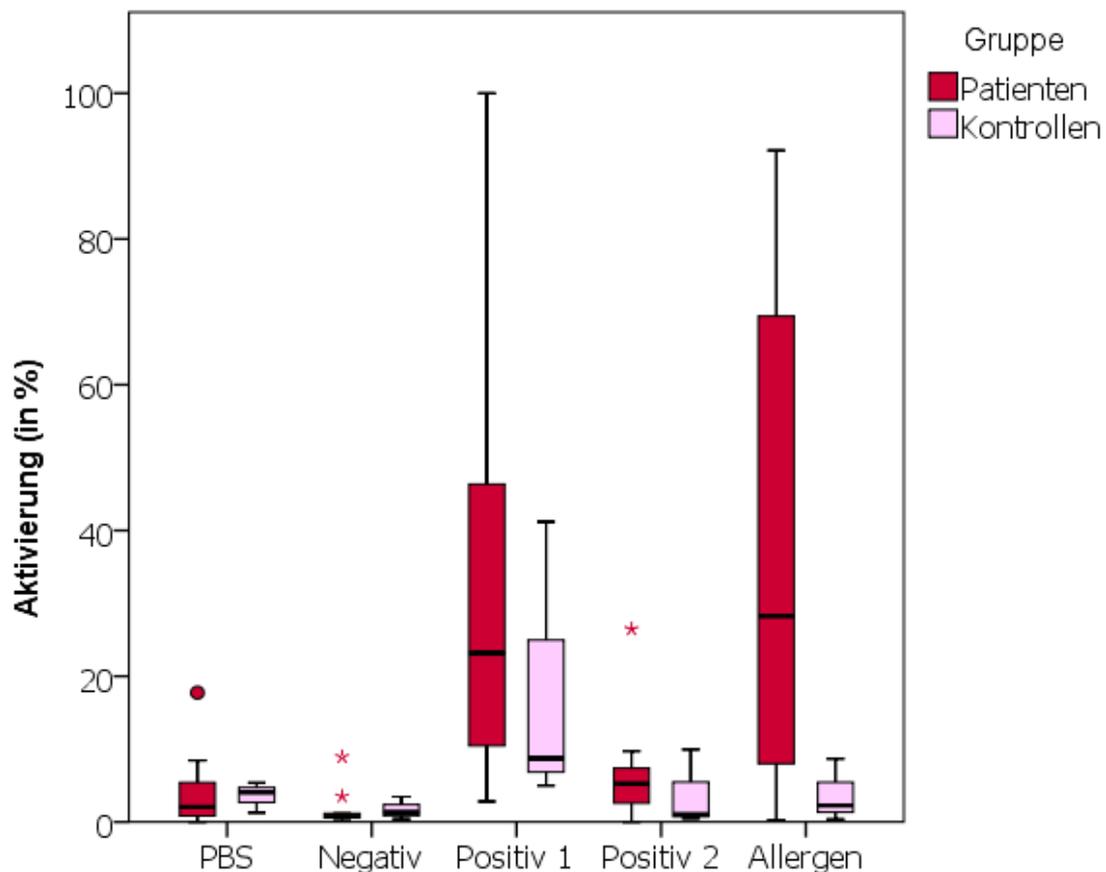
Die teilweise drastischen Unterschiede zwischen den Medianen und Mittelwerten der Messwerte waren dabei den Ausreißern geschuldet. Wurden diese nicht eingeschlossen, lag die größte Streuung in der Positivkontrolle 2 beider Gruppen vor.

Im Vergleich mit den relativen Zellzahlen der anti-CD203c-PE/anti-IgE-FITC positiven Zellen des Protokolls „Zelluläre Marker“ (es wurde nicht zwischen Patienten und Kontrollen unterschieden) fiel auf, dass bei dem Protokoll zum intrazellulären Nachweis von Histamin bei der Patientengruppe in der Negativkontrolle, PBS-Kontrolle und Positivkontrolle 2 im Mittel 2-3fach höhere Zellzahlen gemessen wurden (siehe Kapitel 3.1.1 ).

Die relativen Zellzahlen der Positivkontrolle 1 und des Allergenansatzes hingegen waren beinahe identisch (Protokoll „Zelluläre Marker“: Positivkontrolle 1:  $43,5 \times 10^{-3} \%$ ; Allergen:  $50,6 \times 10^{-3} \%$ ). Die Zellzahlen der Kontrollgruppe des Protokolls „Intrazellulärer Nachweis von Histamin“ waren teilweise sogar um ein Vielfaches höher.

### 3.2.2 Aktivierung der basophilen Granulozyten

Die Aktivierung der basophilen Granulozyten, als prozentualer Anteil der CD63 positiven Zellen an der Gesamtzahl der Basophilen ( $\pm$  SA), ist in folgendem Boxplot (Abbildung 20) dargestellt.



**Abbildung 20:** HistaFlow: Aktivierung der basophilen Granulozyten (CD63<sup>+</sup> in % der Basophilen) in der PBS-Kontrolle, Negativkontrolle, Positivkontrolle 1, Positivkontrolle 2 und Allergenansatz. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartalabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartalabstand von Box entfernt, sowie der Median.

In der Patientengruppe ist in der Positivkontrolle 1 eine mittlere Aktivierung von 34,2 %  $\pm$  31,8 % (Median 23,2 %) gemessen worden, im Allergenansatz waren es 38,1 %  $\pm$  32,7 % (Median 28,2 %). Die mittlere Aktivierung bei der PBS- und Negativkontrolle lag unter 5 %, bei der Positivkontrolle 2 lag sie unter 10 % (Median 5,2 %). Die Streubreite war wiederum sehr hoch (Positivkontrolle 1: Minimum 2,8 %; Maximum 100 %; Allergen: Minimum 0,28 %; Maximum 92,2 %).

In der Kontrollgruppe zeigte sich die größte mittlere Aktivierung bei der Positivkontrolle 1 mit  $18,3 \% \pm 19,9 \%$  (Median  $8,74 \%$ ), die mittlere Aktivierung der übrigen Ansätze lag unter  $5 \%$ .

Die mittleren Aktivierungsraten der anti-CD203c-PE/anti-IgE-FITC positiven Zellen des Protokolls „Zelluläre Marker“ waren bei den Patienten mit  $62,6 \%$  in der Positivkontrolle 1 und  $69,7 \%$  im Allergenansatz beinahe doppelt so groß. Doch auch die Aktivierung in der Negativkontrolle war mit  $35,8 \%$  größer. In der Kontrollgruppe des Protokolls „Zelluläre Marker“ zeigte sich in der Positivkontrolle eine sehr viel deutlichere Aktivierung von  $58,6 \%$ .

### 3.2.3 Indirekte Messung des intrazellulären Histamin

In der folgenden Abbildung 21 wurde der intrazelluläre Nachweis der Diaminoxidase (DAO) und somit die indirekte Messung des Histamins in Bezug zur Aktivierung der basophilen Granulozyten (Marker: anti-CD63-PE-Cy7) gesetzt. Die Messwerte (in  $\% \pm SA$ ) entsprechen dem prozentualen Anteil der entsprechenden Zellen an der Gesamtpopulation der Basophilen.

In der Abbildung 21(a) sind die Basophilen, die DAO negativ und CD63 negativ waren, dargestellt. Bei diesen Zellen wurde intrazellulär kein DAO/Histamin-Komplex angefärbt und sie wurden nicht aktiviert, was charakteristisch für die PBS-Kontrolle wäre.

In der PBS-Kontrolle war sowohl in der Patientengruppe ( $93,3 \% \pm 5,6 \%$ ; Median:  $94,8 \%$ ) als auch in der Kontrollgruppe ( $94,4 \% \pm 2,7 \%$ ; Median  $94 \%$ ), der mittlere Anteil an diesen Zellen am größten. In der Negativkontrolle waren es jedoch im Mittel noch  $73,4 \% \pm 26,9 \%$  (Median  $82,5 \%$ ), bei der Positivkontrolle 2  $62,7 \% \pm 26,5 \%$  (Median  $73,4 \%$ ), bei der Positivkontrolle 1  $39,6 \% \pm 30,3 \%$  (Median  $33,5 \%$ ) und beim Allergen-Ansatz noch  $32 \% \pm 31,5 \%$  (Median  $22,3 \%$ ) der Gesamtzellzahl.

In der Kontrollgruppe war der mittlere Anteil dieser Zellen in der Positivkontrolle 2 größer als in der Negativkontrolle. Zudem waren im Allergenansatz ( $71,9 \% \pm 5,2 \%$ ) deutlich mehr Zellen mit diesen Eigenschaften nachweisbar als bei den Patienten.

Betrachtete man die Streuung und Verteilung der Messwerte, fiel, nach Ausschluss der Ausreißer in allen Ansätzen, in der Patientengruppe eine sehr große Streuung in der Positivkontrolle 1 (Minimum:  $0 \%$ ; Maximum:  $87,4 \%$ ) und in der Positivkontrolle 2 (Minimum:  $24,3 \%$ ; Maximum:  $95,8 \%$ ) auf.

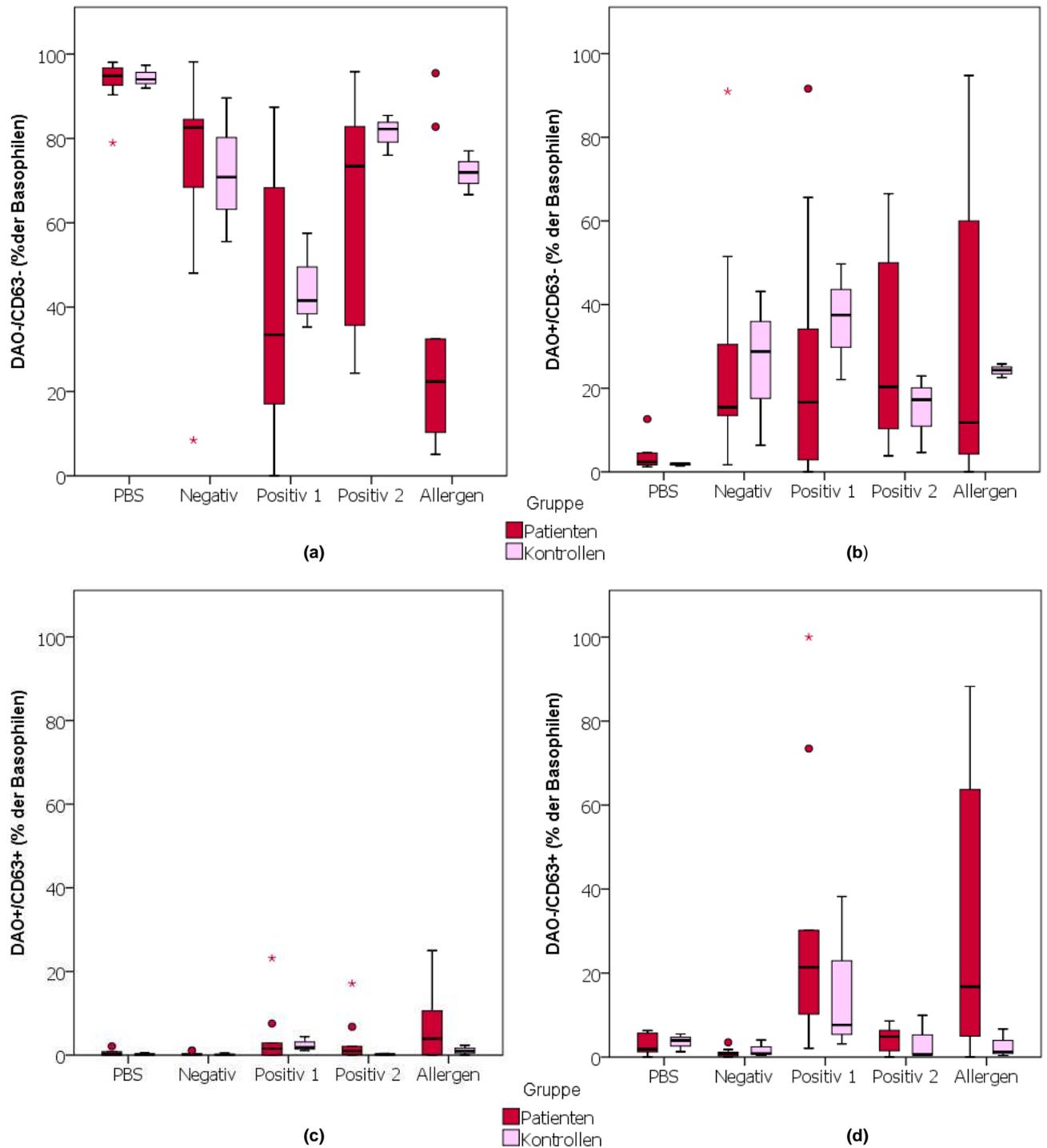


Abbildung 21: HistaFlow: Messung der intrazellulären Diaminoxidase (DAO) in Bezug zu der basophilen Aktivierung (CD63). (a) Zellen waren DAO negativ und nicht aktiviert (b) Zellen waren DAO positiv und nicht aktiviert (c) Zellen waren DAO positiv und aktiviert (d) Zellen waren DAO negativ und aktiviert. Dargestellt sind die Streubreite, der Bereich zwischen dem 1.- und 3. Quartil (Box, mittlere 50 % der Werte), milde Ausreißer (o): bis 1,5x Interquartilabstand von der Box entfernt, extreme Ausreißer (\*): über 1,5x Interquartilabstand von Box entfernt, sowie der Median.

In Abbildung 21(b) ist der prozentuale Anteil der DAO positiven und CD63 negativen Zellen in allen 5 Ansätzen graphisch dargestellt. Diese Zellen waren nicht aktiviert und die Diaminoxidase hat an das intrazelluläre Histamin gebunden, man würde sie demnach in beiden Gruppen überwiegend in der Negativkontrolle erwarten. Bei den Patienten wurde in der Positivkontrolle 2 (30,4 %  $\pm$  24,1 %; Median 20,3 %) und im Allergen-Ansatz (30 %  $\pm$  32,9 %; Median 11,8 %) der höchste Anteil an diesen Zellen verzeichnet. In der Negativkontrolle und Positivkontrolle 1 wurde ein Anteil von ca. 25 % gemessen, in der PBS-Kontrolle waren im Mittel nur 3,6 %  $\pm$  3,4 % der Zellen DAO<sup>+</sup>/CD63<sup>-</sup>.

Bei der Kontrollgruppe hatte die Negativkontrolle mit im Mittel 26,1 %  $\pm$  18,5 den zweitgrößten Anteil (nach der Positivkontrolle 1) an diesen Zellen.

Die Streubreite war in der Patientengruppe, unter Ausschluss der Ausreißer in der Negativ-, und Positivkontrolle 1, insbesondere im Allergenansatz sehr hoch.

Der prozentuale Anteil der DAO und CD63 positiven Basophilen, die zwar aktiviert wurden, aber noch intrazelluläres Histamin besaßen, an welches die Diaminoxidase binden konnte, ist in Abbildung 21(c) zu sehen.

Es fiel auf, dass der größte Anteil dieser Zellen bei der Gruppe der Patienten im Allergen-Ansatz mit im Mittel 6,2 %  $\pm$  8 (Median 3,9 %) zu finden war. Die Messwerte weisen jedoch eine große Streubreite auf (Minimum: 0 %; Maximum: 25 %). Es folgten die beiden Positivkontrollen mit teilweise extremen Ausreißern. In der Negativkontrolle und PBS-Kontrolle war der Anteil jeweils nur gering (0,5 %  $\pm$  0,7 % bzw. 0,3 %  $\pm$  0,4 %).

In der Kontrollgruppe fallen diese Zellen prozentual kaum ins Gewicht.

Die Zellen, die als DAO negativ und CD63 positiv charakterisiert wurden, sind kennzeichnend für die Histaminfreisetzung der basophilen Granulozyten nach Aktivierung durch die Positivkontrollen oder, in der Patientengruppe, durch das Gräserallergen.

Da die Diaminoxidase intrazellulär kein Substrat (Histamin) mehr gefunden hat oder an Histamin gebunden aus der Zelle geschleust wurde, waren diese aktivierten Basophilen DAO negativ.

Wie in Abbildung 21(d) zu sehen, wurde der größte Anteil dieser Zellen im Mittel in der Patientengruppe im Allergenansatz gemessen (31,9 %  $\pm$  32,3 %; Median 16,8 %), gefolgt von der Positivkontrolle 1 (31  $\pm$  31,3 %; Median 21,4 %) wobei jedoch insbesondere im Allergen-Ansatz eine große Streubreite zu berücksichtigen war (Minimum: 0 %; Maximum: 88,2 %). In der Positivkontrolle 2 war hingegen nur ein geringer mittlerer Anteil von 4,3 %  $\pm$  2,9 % (Median 4,9 %) zu verzeichnen.

In der Kontrollgruppe wurde im Allergen-Ansatz erwartungsgemäß kein großer Zellanteil gemessen (Mittelwert 2,8 %  $\pm$  3,4; Median 1,3 %). In der Positivkontrolle 1 lag der Anteil bei im Mittel 16,3 %  $\pm$  19,1 % (Median 7,6 %) und in der Positivkontrolle 2 bei 3,7 %  $\pm$  5,4 % (im Vergleich PBS-Ansatz: 3,6 %  $\pm$  2,1 %).

### 3.3 Vor- und Vergleichsversuche

Um die Zellpermeabilisierung zu optimieren, wurden in Vorversuchen höhere Konzentrationen der Triton X-Lösung (0,25 %, 0,5 % und 5 %) in einem alternativen Flow CAST®-Protokoll verwendet. Zudem wurde in einer Negativkontrolle des Protokolls „Intrazellulärer Histaminnachweis“ Triton X-100 in 5 %iger Lösung getestet. Es zeigte sich jedoch in keinem dieser Versuche einer Verbesserung der Permeabilisierung im Vergleich der PBS- und Negativkontrolle.

Als alternative Permeabilisierungs-Methode wurde ein Saponin-Protokoll, das von Ebo et al. in einer Publikation über die kombinierte durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Signalen und Immunophänotypisierung von basophilen Granulozyten angewendet wurde, durchgeführt.<sup>49</sup> Dabei ließ sich jedoch ebenfalls keine bessere Permeabilisierung erreichen. Bei Versuchen mit dem BD Phosflow Perm Buffer II sowie BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus, zeigte sich eine komplette Zellzerstörung.

Um die generelle Wirkung des angewendeten Triton X-100 auf die Leukozyten zu untersuchen und eine Permeabilisierung nachzuweisen, wurde 200  $\mu$ l Vollblut (jeweils mit entweder EDTA- oder Heparin-Zusatz) nach dem HistaFlow-Protokoll, jedoch ohne Antigen, Antikörper und DAO, verarbeitet. Dabei wurden verschiedene Triton-Konzentrationen (0,1 %, 0,5 %, 5 %) verwendet.

Bei einem Anteil aller Proben erfolgte die Färbung mit Trypanblau nach der ersten Waschung mit Triton X. Die Rest-Suspensionen wurden erst nach der 45minütigen Inkubation mit DAO und Triton X angefärbt. Nach der Färbung folgte jeweils unmittelbar die mikroskopische Beurteilung in der Zählkammer. Dabei fiel auf, dass, unabhängig von der Konzentration des Triton und des Zusatzes, direkt nach der Waschung mit Triton-X blaugefärbte (demnach permeabilisierte/zerstörte) Zellen zu sehen waren, nach der Inkubationsphase jedoch kaum mehr Zellen vorhanden waren. Dieser Versuchsaufbau wurde mit aufgereinigten PBMCs mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

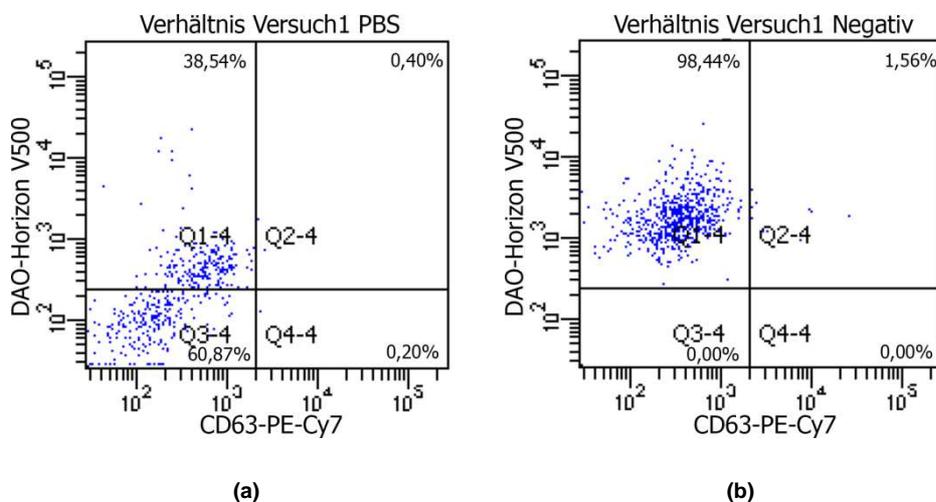
Die Permeabilisierung mit dem verwendeten Triton X schien demnach durchaus zu funktionieren, auch in der Konzentration von 0,1 %, da bereits nach der Waschphase eine

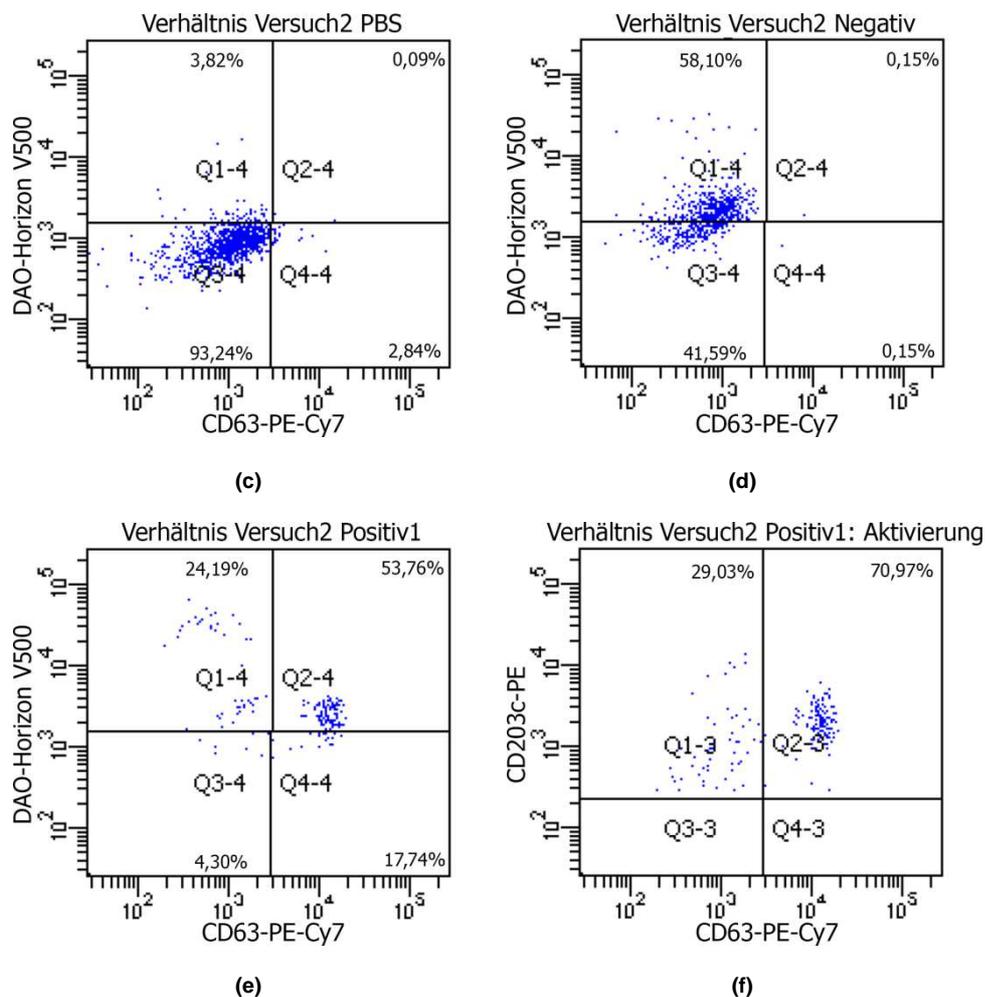
Zelldestruktion nachgewiesen werden konnte und nach der Inkubationszeit scheinbar keine intakten Zellen mehr vorhanden waren. Fraglich ist, inwiefern die letztere Erkenntnis einzuordnen ist, da ja die basophilen Granulozyten im HistaFlow erst nach der Inkubationszeit durchflusszytometrisch analysiert wurden und nachweisbar waren.

Sowohl bei den Vergleichsversuchen mit heparinisiertem Vollblut anstatt EDTA-Blut als auch bei Verwendung des Puffers von Ebo et al. und bei der Anwendung des Protokoll „Ebo et al.“ wurden ebenfalls keine besseren Ergebnisse bezüglich der indirekten Messung von Histamin erzielt.

Auch das Verhältnis des Blutvolumens zum verwendeten Antigen (Allergen/fMLP/anti-FcεRI mAk) und zum Puffer wurde in Vergleichsversuchen verändert und analog zum Flow CAST® berechnet. So wurden bei 200 µl Blut (Flow CAST® 50 µl Blut) 200 µl Antigen und 400 µl Puffer bei ansonsten gleichem Protokoll „Intrazellulärer Histaminnachweis“ verwendet.

Dabei wurde eine Aktivierung von 73 % gemessen, deutlich höher als der Mittelwert der Patientengruppe (unter 40 %), allerdings gab es in dieser Gruppe auch vereinzelt Messwerte in dieser Höhe, so dass weitere Versuche nötig wären, um eine Überlegenheit des Flow CAST®-Verhältnisses zu prüfen. Die Permeabilisierung war in einem Versuch (siehe Abbildung 22, Versuch 1) verbessert, dieser Befund konnte jedoch bei einem anderen Patienten nicht in gleicher Weise reproduziert werden (siehe Abbildung 22, Versuch 2). Dennoch ist auch im 2. Versuch eine marginale Verbesserung im Vergleich zu manchen Probanden ersichtlich.





**Abbildung 22:** Intrazellulärer Nachweis von Histamin mit Blut/Puffer/Antigen-Verhältnis wie im Flow CAST® (a)-(b) Versuch 1, (c)-(f) Versuch 2. In Versuch 1 zeigt sich eine deutliche Permeabilisierung im Vergleich von PBS (ohne Triton X) und Negativkontrolle (mit Triton X), in Versuch 2 bei einem zweiten Patienten war diese nicht eindeutig reproduzierbar.

Schließlich wurde in Vergleichsversuchen das Protokoll für 4 Kompensationsansätze zur Regulierung der Autofluoreszenz der basophilen Granulozyten durchgeführt. Dabei konnte die Verteilung der Zellpopulationen jedoch nicht wie bei Ebo et al. reproduziert werden (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

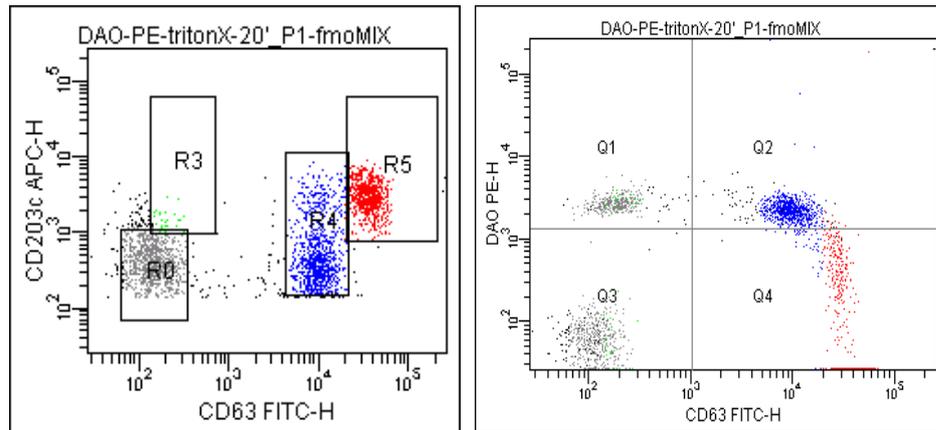


Abbildung 23: Die Verteilung der basophilen Populationen der Kompensationsansätze nach korrigierter Kompensation bei Ebo et al. (persönliche Mitteilung) dunkelgrau DAO+/CD63- (Q1,entspricht Negativkontrolle), hellgrau DAO-/CD63- (Q3), blau DAO+/CD63++ (Q2), rot DAO-/CD63++ (Q4,entspricht Histaminfreisetzung).

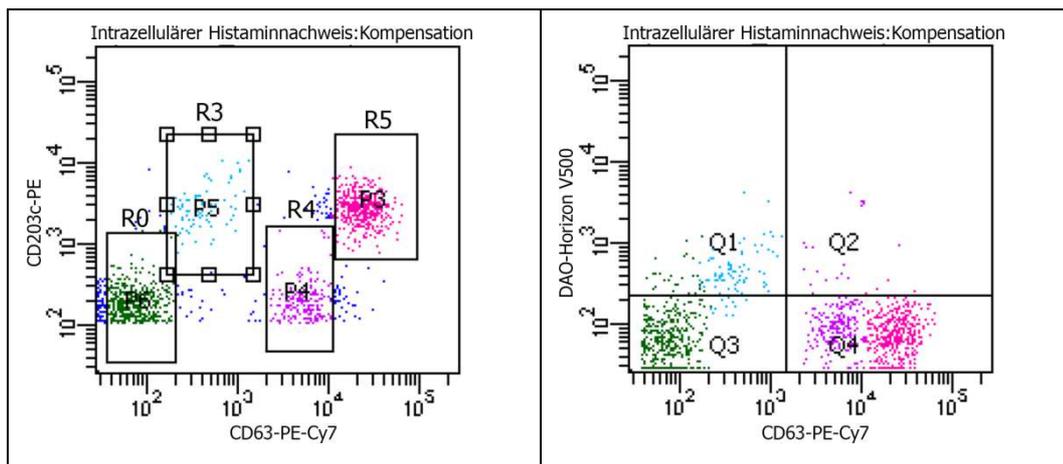


Abbildung 24: Die Verteilung der basophilen Populationen der Kompensationsansätze nach korrigierter Kompensation in dieser Arbeit. Die Populationen DAO+/CD63- (Q1) und DAO+/CD63++ (Q2) sind nicht deutlich erkennbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifikation der basophilen Granulozyten

Mit Hilfe der Multicolor-FACS-Analyse erfolgte in dieser Arbeit eine simultane Messung von Zell-Oberflächenmarkern (CCR3, IgE, CD203c, CRTH2 und CD3) zur Identifizierung von basophilen Granulozyten. Ziel war der direkte Vergleich dieser zellulären Marker. Desweiteren wurde die Aktivierung der identifizierten basophilen Zellpopulation anhand des Aktivierungsmarkers CD63 gemessen und vergleichend analysiert. Als Kontrolle bzw. Standard-BAT wurde bei jedem Probanden auch der industrielle Basophilenaktivierungstest Flow CAST® der Firma Bühlmann Laboratories AG durchgeführt. In der Literatur wurde ein solcher Parallelvergleich mit dieser Anzahl an Markern noch nicht angestellt. Allerdings müssen die Ergebnisse dieser Arbeit immer vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl gesehen werden und können deswegen teilweise nur als beispielhafte Darstellungen eingestuft werden.

#### 4.1.1 Vergleich der zellulären Marker

##### 4.1.1.1 Der Marker CCR3 ( CD193) und seine Kombinationen

Bei den zellulären Markern von BD und Sigma Aldrich wurden in den Positivkontrollen und im Allergenansatz die höchsten relativen Zellzahlen in der Zellpopulation des Markers anti-CCR3-Alexa Fluor 647 gemessen. In der Negativkontrolle war es die zweithöchste relative Zellzahl (siehe Abbildung 10 in Kapitel 3.1.1).

Die relativen Zellzahlen der Populationen, die mit anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD3-PerCP-Cy5.5 und anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-IgE-FITC gelabelt waren, lagen im Mittelfeld.

Der Unterschied der relativen Zellzahl von anti-CCR3-Alexa Fluor 647 zu den anderen Markern (außer zu anti-IgE-FITC, anti-IgE-FITC /anti-CD203c-PE und teilweise anti-IgE-FITC/anti-CCR3-Alexa Fluor 647) ließ sich im verbundenen t-Test auch signifikant nachweisen.

Die Konkordanzanalyse nach Kendall hingegen zeigte, dass aufgrund der signifikanten Messübereinstimmungen, die Zellpopulationen der Marker anti-CD203c-PE, anti-CCR3-

Alexa Fluor 647/ anti-CD3-PerCP-Cy5.5, anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD203c-PE und anti-CRTH2-Horizon V450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5/anti-CD203c-PE möglicherweise Teilmengen der Zellpopulation, die mit anti-CCR3-Alexa Fluor 647 erfasst wurden, darstellen. Beim Vergleich mit anti-IgE-FITC/anti-CD203c-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-IgE-FITC und anti-CRTH2-Horizon V450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5 ließ sich diese Konkordanz nicht in allen Ansätzen signifikant nachweisen, was darauf hinweisen könnte, dass nicht die gleichen Zellen als basophile Granulozyten identifiziert wurden. Allerdings sind insbesondere bei der Konkordanzanalyse die geringe Fallzahl und die hohe Streuung der Messwerte zu berücksichtigen.

Der Marker Anti-CCR3-PE des Flow CAST® der Firma Bühmann, wurde bereits in vielen Studien über die Anwendung des Basophilenaktivierungstest bei der Diagnostik spezifischer Allergien, als auch in der klinischen Routine eingesetzt.<sup>9,29,44,65,77,124,126,128</sup> Das Manual des Flow CAST® gibt dabei vor, dass die absolute Zahl der gezählten Basophilen nicht unter 200 Zellen liegen sollte, über die relative Anzahl in Bezug auf die Gesamtzellzahl wird keine Aussage getroffen.<sup>19</sup> In dieser Arbeit zeigten alle 4 Ansätzen des Flow CAST® im Mittel deutlich höhere Messwerte als die zellulären Marker von BD und Sigma Aldrich. Auch im Vergleich zu anti-CCR3-Alexa Fluor 647 waren die relativen Zellzahlen ungefähr doppelt so hoch (siehe Kapitel 3.1.1). Die großen Unterschiede zwischen den relativen Zellzahlen der getesteten Marker und des Flow CAST® könnten auf eine unterschiedliche Affinität der Antikörper von Bühmann und BD bzw. Sigma Aldrich zu dem jeweiligen Antigen zurückzuführen sein und demnach in der Struktur bzw. Produktion der Antikörper begründet sein.

Uguccioni et al. zeigten, dass der Chemokinrezeptor CCR3 mit bis zu 20.000 Kopien pro Zelle auf der Zellmembran der basophilen Granulozyten und der eosinophilen Granulozyten exprimiert wird. Dabei war das Färbemuster der Zellen, die aus einer Zellsuspension aus 70-80 % Basophilen und 20-30 % Lymphozyten mittels eines Anti-FcεRI-Antikörpers selektiert wurden, einheitlich, was die Autoren auf eine ähnliche Expression pro Zelle schließen ließ.<sup>137</sup>

In einer Studie von Eberlein et al. wurde der Identifikationsmarker anti-CCR3-PE (Flow2 CAST®) mit dem herkömmlichen Marker anti-IgE-FITC (Flow CAST®) im Basophilen Aktivierungstest bezüglich seiner Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose von 24 Patienten mit Antibiotika-Allergie verglichen. Als Aktivierungsmarker wurde in beiden Tests anti-CD63 (anti-CD63-PE und anti-CD63-FITC) genutzt und es gab 15 gesunde Kontrollen. Dabei fiel eine leicht höhere Sensitivität der Kombination anti-CCR3/anti-CD63 (55 % versus 53 %) auf. Die Spezifität war bei beiden Identifikationsmarkern mit 80 % gleich. Somit waren die beiden Kombinationen in etwa gleichwertig.

Monneret et al. gaben in Hinblick auf letztere Arbeit jedoch zu bedenken, dass CCR3 (CD 193) auch auf T-Zellen, vor allem Th2-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen exprimiert sei und diese Zellen nicht durch ihre Light Scatter-Eigenschaft unterschieden werden könnten. Damit wäre eine Verunreinigung des Basophilen-Gates nicht ausgeschlossen. Monneret et al. schlugen deshalb eine Kombination mit dem Marker anti-CD3 zur Differenzierung der basophilen Granulozyten gegenüber CD3 positiven T-Zellen vor.<sup>99</sup>

In einer Studie von Ducrest et al. zur Identifizierung von Basophilen, in der bei 95 gesunden Probanden eine hohe Dichte von CCR3 auf den basophilen Granulozyten gefunden wurde, wurde ein solcher anti-CD3 Antikörper zur Identifizierung der CCR3-positiven Th2-Zellen verwendet, die Anzahl dieser Th2-Zellen war nach Aussagen der Autoren jedoch vernachlässigbar.<sup>36</sup>

Auch Hausmann et al. beschrieben in ihrer Studie mit 94 atopischen und nicht-atopischen Probanden zum Vergleich von CCR3 mit IgE und CD123/HLA-DR als Identifikationsmarker, dass die Kontamination der CCR3<sup>+</sup>-Population mit CD3 positiven Th2-Zellen sehr gering war. Zudem zeigte sich in der Arbeit, dass die Expression von CCR3, anders als IgE, bei Atopikern und Non-Atopikern signifikant konstant war.<sup>65</sup>

Dieses Ergebnisse decken sich mit der Kontaminationsmessung der anti-CCR3-Alexa Fluor 647-Population mit CD3<sup>+</sup>-Zellen in dieser Arbeit, die im Durchschnitt aller Ansätze nur 12,6 % betrug, die höchste Kontamination fand sich dabei in der Positivkontrolle 1 mit 19,2 %, die niedrigste Kontamination in der Negativkontrolle mit 9,4 % (siehe Abbildung 13).

Bei Ducrest et al. wurde zusätzlich ein Anti-IgE Antikörper genutzt und sie gaben an, dass alle CCR3 positiven Zellen auch IgE positiv waren und keine IgE positive CCR3 negative Population gemessen wurde.<sup>36</sup> In dieser Arbeit fanden sich jedoch CCR3 negative Zellen in der anti-IgE-FITC Population, wenn auch nur in allen 4 Ansätzen durchschnittlich 14,8 %. Die Kontamination variierte dabei zwischen den Ansätzen um lediglich 2 % (siehe Abbildung 13).

Auffallend war in der vorliegenden Studie jedoch die Kontamination mit anti-CD203c-PE negativen Zellen (im Mittel aller Ansätze 41,9 %), ähnlich hoch wie bei der anti-CRTH2<sup>+</sup> /anti-CD3<sup>-</sup> Population. Die höchste Kontamination wurde mit 51,4 % wiederum in der Positivkontrolle 1, gefolgt von 40,3 % im Allergenansatz, gefunden. Im Vergleich dazu lag die Kontamination bei IgE nur im Mittel bei 19,6 %. Daraus kann geschlossen werden, dass in dieser Studie anti-IgE-FITC und seine Kombinationen, mit welchen im Vergleich ebenfalls große Zellpopulationen gemessen wurden, anti-CCR3-Alexa Fluor 647 in der Identifizierung der basophilen Granulozyten überlegen war. Die höchste Kontamination bei anti-IgE-FITC wurde ebenfalls in der Positivkontrolle 1 mit 25,8 % gefunden, allerdings diesmal gefolgt von

der Negativkontrolle mit 18,6 %. Die Aktivierung hatte also ebenfalls eine leichte Steigerung der Kontamination zur Folge.

Im Hinblick auf die Messung der Aktivierung bei einer CCR3 Population zeigten Chirumbolo et al. in einer Publikation über verschiedene Gatingstrategien eine Verminderung der Expression von CCR3 nach Aktivierung, was wiederum zu einer Unterschätzung der Expression von CD63 im Vergleich zu dem Protokoll CD123 positiv/ HLA-DR negativ führte.<sup>24</sup> Dieses Phänomen war ursprünglich von Dulkys et al. beschrieben worden.<sup>37</sup>

Bei Hausmann et al. wurde bei Messungen in Vollblut von einem Probandenkollektiv aus 37 Birkenpollenallergikern als auch in purifizierten Basophilen zwar ein geringer Rückgang, jedoch kein signifikanter Verlust der CCR3 positiven Population nach Aktivierung nachgewiesen.<sup>65</sup>

Bei den hier erhobenen Daten war sowohl bei anti-CCR3-Alexa Fluor 647 von BD als auch bei anti-CCR3-PE (Flow CAST®) die relative Anzahl der Basophilen nach Aktivierung im Mittel nicht vermindert, sondern leicht erhöht (siehe Abbildung 10). Der mittlere prozentuale Anteil der CD63 positiven Zellen war jedoch im Vergleich der Marker und Kombinationen von BD nach der anti-CRTH2<sup>+</sup>/anti-CD3<sup>-</sup> Population der zweitniedrigste, sowohl bei den Positivkontrollen als auch beim Allergen-Ansatz. Beim Flow CAST® ergaben sich hingegen die höchsten Werte der CD63 positiven Zellen.

#### **4.1.1.2 Der Marker IgE und seine Kombinationen**

In dieser Arbeit wurden mit dem Marker anti-IgE-FITC bzw. seinen Kombinationen anti-IgE-FITC/anti-CD203c-PE und anti-IgE-FITC/anti-CCR3-Alexa Fluor 647 nach dem Marker anti-CCR3-Alexa Fluor 647 die größten Zellpopulationen als basophile Granulozyten identifiziert, die sich in ihrer Größe im Mittel nicht signifikant von der CCR3-Population unterschieden, jedoch in der Konkordanzanalyse auch keine signifikante Messübereinstimmung ergaben.

Aufgrund dieser Ergebnisse war die Frage zu stellen, ob die markierten Zellen tatsächlich basophile Granulozyten waren. Abuaf et al. fanden in einer Studie mit 74 Probanden (27 Patienten) über den Unterschied von CD63 und CD203c bei der Diagnose von Amoxicillin-Allergie, dass in der IgE positiven Zellpopulation teilweise bis zu 50 % der Zellen (Werte von 0 %-50 %) Monozyten bzw., ein geringer Anteil davon, auch dendritische Vorläuferzellen waren, die ebenfalls FcεRI exprimieren. Mit der Kombination IgE/CD203c konnten diese jedoch ausgeschlossen werden.<sup>2</sup>

Eine noch sehr viel höhere Kontamination des IgE-Gates mit Nichtbasophilen, die als IgE positiv und CCR3 negativ charakterisiert wurden (von bis zu 80 % bei einigen Probanden) beschrieben Hausmann et al.<sup>65</sup>

In dieser Arbeit war die Kontamination der IgE<sup>+</sup>-Population mit CD203c negativen Zellen (<20 %, außer bei Positivkontrolle 1: 25,8 %) signifikant niedriger als bei der CCR3<sup>+</sup>- und der CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Population. Aber auch die Kontamination mit CCR3 negativen Zellen ( im Mittel in allen Ansätzen <15 %) war im Vergleich mit den anderen Kontaminationsmessungen eher niedrig, jedoch im Vergleich zu Ducrest et al. immerhin nachweisbar.<sup>36</sup> Auch Ebo et al. gaben zudem zu bedenken, dass die durchschnittliche Expression von FcεRI auf nichtbasophilen Zellen niedrig sei.<sup>47</sup>

Die Kontamination des IgE-Gates scheint in der Zusammenschau demnach sehr variabel zu sein, ebenso wie die interindividuelle Expression von FcεRI auf den basophilen Granulozyten. Dies wurde von einigen Autoren als großer Nachteil dieses Markers gesehen, wie auch die Abhängigkeit der Expression vom Gesamt-IgE-Level, da somit bei niedrigem Gesamt-IgE das Gating erschwert werden könne.<sup>24,65,99</sup> Al de Weck et al. hingegen waren der Ansicht, dass mit bestimmten Gatingstrategien (z.B. IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>) trotzdem eine hinreichende Identifizierung der Basophilen (bis 95 % Purity) erreicht werde. Da in dieser Arbeit nur 3 Kontrollen ohne atopischen Hintergrund vergleichend hinzugezogen wurden, kann dazu keine valide Aussage getroffen werden. Die relative Anzahl der mit anti-IgE-FITC gelabelten als basophile Granulozyten identifizierten Zellen, ist jedoch bei den gesunden Kontrollen außer in der Positivkontrolle im Mittel etwas geringer.

In der Literatur wurde auch eine Aktivierung der basophilen Granulozyten durch den Marker anti-IgE diskutiert.<sup>47,53</sup> In dieser Arbeit zeigte sich bei den Negativkontrollen der IgE<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>-Zellen eine Aktivierung von 19,8 %, im Vergleich mit der CCR<sup>+</sup>-Population (12,9 %) und CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>-Population (12,7 %) etwas erhöht, insgesamt jedoch im Mittelfeld (siehe Abbildung 14). Bei den IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen hingegen waren in der Negativkontrolle bereits 35,8 % der Zellen aktiviert. Dies wurde aber eher im Zusammenhang mit dem Marker anti-CD203c-PE gesehen (siehe Kapitel 4.1.1.3)

Zusammenfassend war Anti-IgE in dieser Arbeit mit den vergleichsweise niedrigen Kontaminationen, im direkten Vergleich mit den anderen Markern, ein guter singulärer Marker für die Identifikation der basophilen Granulozyten. Die Kombinationen anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CD203c<sup>+</sup> und anti-IgE<sup>+</sup>/anti-CCR3<sup>+</sup> erbrachten ähnliche Ergebnisse (siehe Abbildung 10).

#### 4.1.1.3 Der Marker CD203c und seine Kombinationen

Das Oberflächenantigen CD203c konnte im hämatopoetischen System bisher nur auf basophilen Granulozyten, Mastzellen und CD34-Progenitorzellen dieser Zelllinien nachgewiesen werden.<sup>20,21,59,60</sup> Da die Basophilen somit die einzigen Leukozyten im peripheren Blut sind, die diesen Marker aufweisen und die Expression von CD203c auf der Zellmembran nach Aktivierung hochreguliert wird, wird CD203c als Aktivierungsmarker beim Basophilenaktivierungstest eingesetzt.<sup>14,17,21,47,67,116</sup> 43

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt aber nicht auf die Messung der Aktivierung, sondern auf die Identifizierung der Basophilen anhand des Markers anti-CD203c-PE und dessen Kombinationen mit anderen Markern gesetzt.

Platz et al. veröffentlichten eine Studie von 22 Patienten mit Bienen- oder Wespenallergie und 13 gesunden Kontrollen, bei welchen sowohl die Identifizierung als auch die Messung der Aktivierung anhand der Expression von CD203c erfolgte.<sup>116</sup> Auch Hauswirth et al. wandten diese Technik bei 27 Birken- oder Gräserpollen-Allergikern im Rahmen des Vergleichs mit dem Anti-IgE/CD63 Protokoll an.<sup>66</sup> Dabei konnten bereits die unstimulierten basophilen Granulozyten durch die Expression von CD203c von den restlichen Leukozyten differenziert werden (die Spezifität wurde durch Zellsortierung nachgewiesen). Nach Aktivierung wurde dann eine starke Hochregulierung des Markers gemessen, so dass der gesamte Basophilenaktivierungstest mit einem singulären Marker erfolgte.<sup>66,116</sup>

Boumiza et al. versuchten dieses Protokoll bei einer Studie mit Patienten mit Latexallergie anzuwenden, jedoch wurde bei 40 % der Probanden (Patienten und Kontrollen) CD203c von einem Teil der Basophilen in unstimuliertem Zustand so schwach exprimiert, dass sie von den anderen Leukozyten nicht differenziert werden konnten und somit aus der weiteren Analyse herausgefallen wären. Die Autoren kombinierten aus diesem Grund CD203c mit Anti-IgE und beschrieben damit eine sehr viel höhere Identifizierungsrate.<sup>18</sup>

Diese Beobachtung wurde von Ocmant et al. in einer Studie über Patienten mit Katzenhaarallergie bestätigt. Auch sie beschrieben bei etwa der Hälfte der Probanden eine, für die Phänotypisierung zu schwache, Expression von CD203c vor Aktivierung, so dass ebenfalls eine Kombination mit Anti-IgE favorisiert wurde.<sup>109</sup> Von anderen Autoren wurde dieser Nachteil von CD203c aufgegriffen und auch Ebo wandte für die basophile Identifizierung beim HistaFlow die Kombination CD203c/IgE an.<sup>48,108</sup>

In dieser Arbeit war die relative Zellzahl der CD203<sup>+</sup>-Population im Vergleich mit den anderen Markern eher im unteren Mittelfeld (im Mittel aller Ansätze 37,4 % x 10<sup>-3</sup>). Die höchste Messung ergab sich für den Allergenansatz mit 43,4 % x 10<sup>-3</sup>, die niedrigste

Messung mit  $30,4 \% \times 10^{-3}$  allerdings bei der Positivkontrolle 1. Auch bei den Kombinationen mit anderen Markern (anti-IgE-FITC; anti-CCR3-Alexa Fluor 647; anti-CRTH2-Horizon 450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5) wurde in den unstimulierten Negativkontrollen nicht die geringste Zellzahl gemessen. Im Allergenansatz war jedoch, außer bei der Kombination anti-CRTH2-Horizon 450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5/anti-CD203c-PE, jeweils die höchste Zellzahl von allen 4 Ansätzen zu verzeichnen (siehe Abbildung 10). Interleukin-3, welches in einer Konzentration von 3 ng/ml in dem verwendeten Stimulationspuffer des Flow CAST® vorhanden ist, hätte eine mögliche Hochregulation von CD203c durch zur Folge haben können.<sup>21,28,47</sup> Dies schien in dieser Arbeit bei der Identifikation der basophilen Granulozyten durch anti-CD203c im Vergleich zu anderen Markern in Anbetracht der Zellzahlen jedoch keine Rolle zu spielen.

Insgesamt gesehen war es nicht möglich, aus diesen inhomogenen Ergebnissen den Schluss zu ziehen, dass, wie bei Boumiza und Ocmant beschrieben, ohne Aktivierung weniger Zellen als Basophile phänotypisiert werden konnten. Allerdings war die  $IgE^+/CD203c^+$  Zellpopulation in allen 4 Ansätzen mit im Mittel  $45 \% \times 10^{-3}$  sehr viel größer als die  $CD203c^+$ -Population (im Mittel aller Ansätze  $37,4 \% \times 10^{-3}$ ) und sogar vergleichbar mit den Populationen von anti-CCR3-Alexa Fluor 647 (nur in der Positivkontrolle 1 signifikant kleiner) und anti-IgE-FITC. Die Kombination  $CCR3^+/CD203c^+$  erbrachte jedoch wiederum etwas geringere Zellzahlen (im Mittel  $41,9 \% \times 10^{-3}$ ), was aber vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl vernachlässigt werden sollte. Die deutlich niedrigeren Messungen bei der Kombination  $CRTH2^+/CD3^-/CD203c^+$  sind wohl unabhängig vom Marker anti-CD203c-PE zu bewerten (siehe Kapitel 4.1.1.4).

Bei der Kontamination mit CD203c negativen Zellen bei den Markern anti-CCR3-Alexa Fluor 647, anti-IgE-FITC und anti-CRTH2-Horizon 450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5 fiel auf, dass, außer bei den  $IgE^+/CD203c^-$ -Zellen, die höchsten Kontaminationen in der Positivkontrolle und im Allergenansatz auftraten (siehe Abbildung 13).

Insgesamt ließ sich aus den erhobenen Daten bestätigen, dass die Kombination anti-IgE-FITC/anti-CD203c-PE sehr geeignet für die Phänotypisierung der basophilen Granulozyten war und im Vergleich höhere Zellzahlen als der singuläre Marker anti-CD203c-PE ergab.

#### **4.1.1.4 Die Markerkombination CRTH2/CD3**

In Hinblick auf die Ergebnisse von Abuaf et al. bezüglich der hohen Kontamination der  $IgE^+$ -Population mit Monozyten (siehe Kapitel 4.1.1.2) und der Variabilität der IgE-Expression auf der basophilen Zelloberfläche, schlug G. Monneret die Marker-Kombination anti-CRTH2/anti-CD3 als bessere Alternative zur Identifizierung der basophilen Granulozyten vor. Dabei sah

er zum einen den Vorteil bei der hohen Selektivität von anti-CRTH2 für Th2-Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten und zum anderen bei der eindeutigen Differenzierung der basophilen Granulozyten gegenüber der Th2-Zellen als CD3 negative Zellen (die Eosinophilen wurden aufgrund ihrer Light Scatter-Eigenschaft unterschieden).<sup>100</sup>

In dieser Arbeit waren die Zellzahlen der mit anti-CRTH2-Horizon 450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5, und anti-CRTH2-Horizon 450/anti-CD3-PerCP-Cy5.5/anti-CD203c-PE konjugierten Zellen in allen 4 Ansätzen am niedrigsten, wobei insbesondere die CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD203c<sup>+</sup> Zellpopulationen sehr klein waren (CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD203c<sup>+</sup> im Mittel aller Ansätze 23,3 % x 10<sup>-3</sup>, im Vergleich CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> 35,9 % x 10<sup>-3</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> 37,9 % x 10<sup>-3</sup>, CCR3<sup>+</sup> 48,6 % x 10<sup>-3</sup>; siehe Abbildung 10). Die Aktivierung schien keinen direkten Einfluss auf die Zellzahl zu haben. Im Gegensatz dazu beschrieben Boumiza et al. eine Studie mit 18 Probanden mit Latex-, oder Dermatophagoides pteronyssinus-Allergie, bei welchen die Identifizierung mit der Markerkombination CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (anti-CRTH2-FITC, anti-CD3-PC5) erfolgte und so im Vergleich mit den Markern anti-IgE- bzw. anti-CD123 bis zu 50 % mehr Basophile identifiziert wurden. CD203c wurde dabei nur als Aktivierungsmarker genutzt.<sup>17</sup>

Gründe für diese starke Diskrepanz könnte eine zu geringe Affinität des Antikörpers Anti-CRTH2 von BD bzw. eine zu schwache Konjugation dieses Antikörpers mit Horizon 450 sein. Dies ließe sich nur durch den Vergleich mit einem anderen Antikörper gegen CRTH2 ausschließen, der in dieser Arbeit nicht erfolgte. Zum anderen hat das Fluorochrom Horizon V450, welches in dieser Arbeit an CRTH2 gekoppelt ist, hat eine geringere Helligkeit als PE, Alexa Fluor 647 oder auch FITC. Dies könnte der Grund sein, warum die Kombination CRTH2/CD3 im Vergleich mit den anderen Markern in allen Fragestellungen kleinere Messwerte ergibt.

Dass bei der Kombination mit CD203c die Zellzahl nochmals deutlich gesunken war, ließ auf eine hohe Kontamination mit Nichtbasophilen in der CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> Population schließen. So lag die Kontamination mit CD203c negativen Zellen auch im Mittel bei 45,6 %. Die höchsten Kontaminationen ließen sich mit 49,6 % in der Positivkontrolle und mit 47,5 % im Allergensatz finden. In der Negativkontrolle lag die Kontamination jedoch auch bei 44,6 %.

### 4.1.1.5 Die Markerkombination CD123/HLA-DR

Eine weitere Markerkombination zur Identifizierung basophiler Granulozyten ist anti-CD123<sup>+</sup>/anti-HLA-DR<sup>-</sup>, die ursprünglich zur Identifizierung von dendritischen Zellen genutzt wurde. HLA-DR steht für Humanes Leukozyten Antigen, CD123 ist eine  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-3-Rezeptors, einem Klasse I Zytokin-Rezeptor.<sup>24,98</sup>

Chirumbolo et al. zeigten in einer Studie mit angereicherten Basophilen von 32 nicht allergisch und nicht atopischen Probanden, dass die Expression von CD123 (bei Identifikation durch anti-CD123-PerCP-Cy5.5/anti HLA-DR-PE-Cy7) sich nach Aktivierung signifikant weniger veränderte als die Expression von CCR3 (anti-CCR3-PE) und CD203c (anti-CD203c-PE), allerdings war die interindividuelle Variabilität der CD123-Expression in der nicht aktivierten Basophilen-Population relativ hoch. Auch Hausmann et al. demonstrierten diese Variabilität in der Studie über CCR3 im Vergleich zu CD123/HLA-DR und IgE (vergleiche Kapitel 4.1.1.1).

Im Vergleich zu den Markern CRTH2/CD3 (anti-CRTH2-FITC, anti-CD3-PC7) wurde in einer Studie von Sturm et al. bei der anhand der Identifizierungsmarker CD123/HLA-DR (anti-CD123-PE/anti-HLA-DR-PC5) erfassten Zellpopulation eine signifikant niedrigere Aktivierung gemessen. Beim Vergleich mit den weniger hellen Fluorochromen bei anti-CD123-FITC/ anti-HLA-DR-PC5 war dieser Unterschied jedoch nicht mehr signifikant.<sup>135</sup>

In einer Arbeit von Michova et al. wurden 2 Basophilenaktivierungstests und somit die Identifikation anhand des Marker anti-FcεRI (Basotest) mit der Identifikation durch anti-CD123/anti-HLA-DR (FastImmune) bei Patienten mit Gräserpollenallergie (Basotest: 50 Patienten, FastImmune: 30 Patienten) und 14 Kontrollen verglichen. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivierungsraten feststellen, die Sensitivität und Spezifität des Basotest waren mit 100 % und 85 % im Vergleich zu 92 % und 72 % etwas höher als für den Test FastImmune.<sup>98</sup>

In dieser Arbeit wurde die Markerkombination CD123/HLA-DR nicht berücksichtigt.

### 4.1.2 Messung der Aktivierung

Die Messung der basophilen Aktivierung nach der Phänotypisierung durch die verschiedenen Oberflächenmarker und deren Kombinationen erfolgte anhand des Tetraspanins CD63, dessen Expression, im Gegensatz zu CD203c, erst nach Aktivierung auf der Zellmembran der basophilen Granulozyten nachweisbar ist und bereits in vielen Studien Anwendung fand.<sup>28,44,49,51,77,80,125 52,101,114,123</sup> Auch im Flow CAST®, der Referenzmessung, ist Anti-CD63 enthalten, allerdings an FITC konjugiert, während bei der Multicolor-Analyse der verschiedenen zellulären Marker der Antikörper PE-Cy7 benutzt wurde.

In dieser Arbeit wurde lediglich in der Negativkontrolle des Flow CAST® eine Aktivierung unter 5 % gemessen, was in der Literatur allgemein als Richtwert angesehen wird.<sup>28</sup> Die mittlere Aktivierung bei den anderen Markern war in der Patientengruppe teilweise unter 15

% (CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CCR3<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>), aber auch darüber (höchster Wert IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> 35,8 %).

Dies war jedoch auch der großen Streubreite und der, teilweise drastischen, Ausreißer der Messwerte geschuldet. Die Mediane waren insgesamt niedriger. Auffallend war dennoch, dass insbesondere die Negativkontrollen der Zellpopulationen des Markers anti-CD203-PE und seiner Kombinationen eine hohe Aktivierung aufwiesen (in der Patientengruppe CD203c<sup>+</sup>-Zellen 20,8 % (Median 10,3 %), IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen 35,8 % (Median 23,7 %), CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen 20,2 % (Median 10,9 %)). In der Kontrollgruppe war dies, bei ähnlichen Werten bis auf die CD203c<sup>+</sup>-Population mit 8,9 % (Median 6,5 %), ebenfalls der Fall. Eine mögliche Hochregulation von CD203c durch Interleukin-3 (3 ng/ml im Simulationspuffer) über einen PI3-Kinase Signalweg, die Hauswirth et al. bei Konzentrationen von 0,1-1ng/ml Interleukin-3 für Allergiker und gesunde Kontrollen gleichermaßen demonstrierten, war nicht auszuschließen. Allerdings gaben sowohl Hauswirth et al. als auch Bühring et al. an, dass CD63 dabei keine erhöhte Expression zeigte. Somit ließe sich der hohe Basalwert der CD63 Expression als auch die starke Aktivierungsrate nur durch eine Überrepräsentation von CD203c positiven Zellen, die auch CD63 positiv waren, erklären. Die gemessenen Zellzahlen der CD203c positiven Zellen (und Kombinationen) waren jedoch in allen 4 Ansätzen nur im Mittelfeld (siehe Kapitel 4.1.1.3).

Gründe für eine falsch hohe Negativkontrolle, wie eine zeitnahe Allergenexposition, oder die Einnahme bestimmter Medikamente, insbesondere Glukosteroide, wurden im Vorfeld anamnestisch ausgeschlossen, zudem hätte sich dies auf alle Negativkontrollen, also auch auf den Flow CAST® auswirken müssen. Die Lagerung der Blutproben erfolgte regelhaft und andere technische Fehler, wie Verunreinigung durch Endotoxine oder Pyrogene konnten zwar nicht sicher ausgeschlossen werden, waren jedoch als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen.

Bei den Positivkontrollen beider Gruppen zeigte sich kein Nonresponder. Die Aktivierung in der Positivkontrolle 1 und im Allergenansatz der Patientengruppe war im Flow CAST® jeweils am deutlichsten zu verzeichnen (über 75 %), der Unterschied war im Vergleich zu allen anderen Markern in der Positivkontrolle 1 und dem Allergenansatz signifikant (siehe Abbildung 15 und Abbildung 17).

Im Vergleich der zellulären Marker zeigte die Kombination IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> bei den Patienten mit 62 % bei der Positivkontrolle 1 und 70 % beim Allergenansatz die höchste Aktivierungsrate, jedoch auch, wie bereits erwähnt, in der Negativkontrolle. Die CD203c<sup>+</sup>-Zellen und CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen lagen in der Positivkontrolle 1 über 50 % und im Allergenansatz über 60 %. Die mit anti-CCR3-Alexa Fluor 647 konjugierten Zellen wiesen

eine deutlich geringere Aktivierung (Positivkontrolle 1 32 %, Allergen 43,2 %) auf, die niedrigsten Aktivierungsraten zeigten sich jedoch, analog zu den Zellzahlen bei der Identifizierung, bei der Markerkombination CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (siehe Abbildung 15 und Abbildung 17). Auch in der Arbeit von Sturm et al. zeigte sich im Vergleich der Markerkombinationen anti-HLA-DR-PC5/anti-CD123-PE und anti-CRTH2-FITC/anti-CD3PC7 eine schwächere CD63-Expression bei letzterer Kombination. Die Autoren begründeten dies jedoch mit der höheren Helligkeit von PE im Vergleich zu FITC, die eine bessere Identifizierung der basophilen Granulozyten erlauben würde.<sup>135</sup> (Siehe 4.1.1.4) Das Fluorochrom Horizon V450, welches in dieser Arbeit an CRTH2 gekoppelt ist, hat eine geringere Helligkeit als PE, Alexa Fluor 647 oder auch FITC. Dies könnte in Hinblick auf Sturm et al. die geringe Aktivierungsrate erklären.

In der Positivkontrolle 2, in welcher die Basophilen mit fMLP aktiviert worden waren, fiel bei der Patienten- und Kontrollgruppe eine insgesamt sehr schwache Aktivierung auf. So lag der Höchstwert in der Patientengruppe bei 40,9 % für die IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup>-Zellen, beim Flow CAST® wurde nur eine mittlere Aktivierung von 20,4 % erreicht (siehe Abbildung 16). Für den Flow CAST® wurde jedoch in der Gebrauchsanweisung festgelegt, dass bereits bei einer Aktivierung über 10 % (in einer der beiden Positivkontrollen) die Patientenprobe auswertbar sei.<sup>19</sup> In der Literatur werden keine Richtwerte für die Aktivierung (weder fMLP, noch FcεRI oder Allergen) angegeben und die Messwerte in Arbeiten mit CD63 schwanken, so dass ein Vergleich erschwert war.<sup>18,44,127 101</sup> Beispielsweise wurde aber in einer Arbeit von Monneret et al. über den Vergleich des basophilen Aktivierungstest mit der Messung von spezifischen IgE und Histamine Release Tests bei Patienten mit Allergie gegen Muskelrelaxanzien die Aktivierungsraten nach Stimulation durch fMLP aufgeführt. Dabei wurde in einem CCR3-Protokoll (anti-CCR3-PE) eine höhere Aktivierung (31,2 %) als in einem IgE-Protokoll (14,5 %, anti-IgE-FITC) gemessen.<sup>101</sup> In dieser Arbeit zeigte das CCR3-Protokoll eine mit 22,3 % eine niedrigere Aktivierung, der Marker anti-IgE wurde nur in Kombinationen (IgE/CCR3 und IgE/CD203c) untersucht, diese wiesen jedoch eine höhere Aktivierung auf (30,4 % und 40,9 %).

Insgesamt fiel auf, dass für die Zellpopulationen des Markers anti-CD203c-PE und dessen Kombinationen zwar in der Negativkontrolle eine Aktivierung von über 15 % gemessen wurde, sie aber nach Aktivierung auch die höchsten Werte neben dem Flow CAST® erzielten.

Zur besseren Beurteilung wurden deswegen die Delta-Werte, also die Differenzen zwischen den Werten der Positivkontrollen bzw. des Allergenansatzes und den Messungen der Negativkontrollen, berechnet.

Auch bei den Deltawerten zeigten sich in der Positivkontrolle 1 und im Allergenansatz bei den Patienten im Mittel die höchsten Werte der CD63-Aktivierung bei den Markern anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD203c-PE, anti-CD203c-PE, und anti-IgE-FITC/anti-CCR3-Alexa Fluor 647. Im Vergleich mit dem Deltawert der Kombination anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-CD63-PE-Cy7 (als Standard) waren die Aktivierungsraten bei diesen Markern in der Positivkontrolle 1 und dem Allergen-Ansatz sogar signifikant höher (bei der CCR3/CD3<sup>+</sup> und IgE/CD203c nur in der Positivkontrolle 1).

Im Vergleich zu den Deltawerten des Flow CAST® waren in der Patientengruppe die Deltawerte aller einzelnen zellulären Marker und Markerkombinationen in der Positivkontrolle 1 und im Allergenansatz signifikant niedriger.

Zusammenfassend konnte also, trotz den hohen Messungen in der Negativkontrollen, mit anti-CD203c-PE und dessen Kombinationen, aber auch mit anti-CCR3-Alexa Fluor 647/anti-IgE-FITC bessere Aussagen über die Aktivierung der basophilen Granulozyten getroffen werden als mit anti-CCR3-Alexa Fluor als singulärer Marker. Der Standard des Flow CAST® wurde aber mit keinem der Marker erreicht.

Der Vorteil von CD203c und dessen Kombinationen könnte, auch wenn die Messung der Aktivierung mit CD63 erfolgte, die Hochregulierung von CD203c nach Aktivierung (Boumiza et al. beschrieben eine Steigerung bis zu 350 %) und somit bessere Erfassung der aktivierten Basophilen für die Messung von CD63 sein.<sup>18</sup> Bei CCR3 erschwerte eventuell eine verminderte Expression nach Aktivierung (wenn auch in der relativen Zellzahl nicht ersichtlich), die in Literatur von Dulkys und Chirumbolo beschrieben wurde, die Messung.<sup>25,37</sup>

Eine zusätzlich mögliche Beeinträchtigung der Messung von CD63 durch Degradation des Tandemfluorochroms PE-Cy7 im Vergleich zum CD63-FITC aus dem Flow CAST®, die ebenfalls die teilweise niedrigen Aktivierungsraten erklären könnte, wird in Kapitel 4.2.3.3.2 diskutiert.

## 4.2 Intrazellulärer Nachweis von Histamin

In dieser Arbeit wurde versucht, den sogenannten „HistaFlow“, ein Verfahren, welches von Ebo et al. 2011 im Journal of Immunological Methods vorgestellt wurde, anhand der genannten Publikation zu reproduzieren und zu etablieren.

Bei der Kombination aus einem Basophilenaktivierungstest und der indirekten Messung des intrazellulären Histamin bzw. der Histaminfreisetzung durch die Fluorochrom-konjugierte

Diaminoxidase, wird eine durchflusszytometrische Methode zur funktionellen Messung von Histamin bei basophilen Granulozyten eingesetzt.<sup>48</sup>

#### 4.2.1 Publierte Studien mit dem HistaFlow

Bisher wurden 2 Studien zum Thema HistaFlow veröffentlicht.

Die erste Arbeit über den HistaFlow aus dem Jahr 2011 umfasste ein Probandenkollektiv von 19 Patienten mit Birkenpollenallergie sowie 5 gesunde Kontrollen. Es wurde das Protokoll sowie die Entwicklung des Verfahrens vor dem Hintergrund der Enzym-Affinitäts-Gold-Methode zur intrazellulären Anfärbung von Histamin von Dvorak et al. beschrieben.<sup>48</sup>

Schwerpunkt der Studie war die Untersuchung der Kinetik der Histaminfreisetzung und die Evaluation der 2 Degranulationsformen, der „Piecemeal“- und der anaphylaktischen Granulation im Zusammenhang mit der Expression von CD63 und CD203c (siehe 1.1.1). Als allgemeine Hypothese galt, dass die totale Histaminfreisetzung die Summe aus beginnender „Piecemeal“- und folgender anaphylaktischer Degranulation sei.<sup>48</sup>

Nach Aktivierung durch Anti-IgE, Allergen, fMLP oder PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) plus Ionomycin kam es zu einer schnellen Histaminfreisetzung (Maximum nach 5-20 min und Plateau für 1 h). PMA alleine führte zu einer langsamen Histaminfreisetzung nach 20min, die sich für 1 h langsam steigerte.<sup>48</sup>

Es zeigte sich zudem, dass eine komplette Histaminfreisetzung im Sinne einer anaphylaktischen Degranulation (Zellen wurden DAO negativ) nach Kreuzvernetzung von IgE nur bei CD203c positiven und CD63 positiven Zellen erfolgte, nicht jedoch bei CD203c positiven und CD63 negativen bzw. CD63 schwachen Zellen.<sup>48</sup>

Eine Ausnahme zeigte sich jedoch nach Stimulation mit PMA und der niedrigsten bzw. den 2 höchsten Konzentrationen von PMA plus Ionomycin, wo eine langsame Histaminfreisetzung durch CD203c positive CD63 negative bzw. CD63 schwache Zellen erfolgte. Dies würde nach Ebo et al. für die alternative Histaminfreisetzung durch „Piecemeal“- oder einer frustranen Form der anaphylaktischen Degranulation nach Aktivierung durch PMA sprechen. Somit bestätigte sich die allgemeine Hypothese, dass eine anaphylaktische Degranulation nur bei der Hochregulierung von CD63 erfolge und CD203c in Zusammenhang mit der „Piecemeal“-Degranulation stehe.<sup>48</sup>

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Wirkung einer Inkubation mit IL-3 auf die Aktivierung der basophilen Granulozyten untersucht. So zeigte sich unter anderem (wie bei Bühring et al. und Hauswirth et al. beschrieben) bei einigen Patienten eine Verstärkung der basophilen

Aktivierung mit Hochregulation von CD203c, jedoch ohne CD63-Expression, auch ohne Stimulation durch Allergen (siehe Kapitel 4.1.2).<sup>21,67</sup> Auffällig war dabei eine Steigerung der DAO positiven Zellen in dieser Zellpopulation. Die Autoren stellten die Hypothese auf, Grund dafür könnte eine Veränderung des Zugangs zu den Histaminspeichern oder eine erhöhte de novo Synthese von Histamin sein. Diese Steigerung der DAO positiven Zellen wurde jedoch auch in der CD63 negativen Zellpopulation ohne Il-3-Inkubation gesehen, was nach Ebo et al. auf ein autokrines oder parakrines Priming durch, nach Aktivierung produziertes, Il-3 schließen könnte. Aber auch einen zu dem Messzeitpunkt noch unvollständige Degranulation mit besserem Zugang der DAO zu dem in den Granula gespeicherten Histamin, könnte dafür verantwortlich sein.<sup>48</sup>

In der 2. Arbeit von Nullens et al. wurde der HistaFlow zur Beurteilung der Wirkung der spezifischen Immuntherapie (SIT) auf die basophilen Granulozyten bei Wespengiftallergie genutzt. Dabei wurde sowohl der Histamingehalt der Zellen, als auch die Histaminfreisetzung nach Stimulation durch Wespengift beurteilt. Parallel erfolgte eine durchflusszytometrische Zählung der Basophilen.<sup>108</sup>

Dabei wurde bei 23 Patienten eine spezifische Immuntherapie (ALK-Abello, A/s, Dänemark) mit einer 3 tägigen Aufdosierungsphase und anschließend monatlicher Erhaltungsdosis durchgeführt. Die Blutentnahmen für die Untersuchungen erfolgten dabei kurz vor der ersten Injektion und nach der letzten Injektion der Aufdosierung. Bei 14 Patienten wurden nach 6 Monaten dieser SIT direkt vor der erneuten Injektion ebenfalls ein HistaFlow und eine Zellzählung durchgeführt. Zusätzlich wurden 10 Kontrollen untersucht.<sup>108</sup>

Die Zahl der basophilen Granulozyten war bei den Patienten vor Therapie im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, sank jedoch in der Aufdosierungsphase (von  $35,8 \times 10^3/\text{ml}$  auf  $24,6 \times 10^3/\text{ml}$ ). Nach 6 Monaten der SIT waren die Zellzahlen wieder auf das Niveau vor Behandlung gestiegen ( $32,45 \times 10^3/\text{ml}$ ).<sup>108</sup>

Auch der basophile Histamingehalt (Messung nach Stimulation mit Wespengift) war vor Beginn der SIT höher als bei den Kontrollen, er war nach der Aufdosierungsphase nur gering gesunken, nach der 6 monatigen Erhaltungstherapie war er jedoch im Mittel auf die Hälfte reduziert. Die Histaminfreisetzung war nach 6 Monaten der SIT ebenfalls signifikant niedriger als vor Therapie.<sup>108</sup>

Die Autoren sehen die Abnahme der Zellzahl der basophilen Granulozyten in der Aufdosierungsphase in Zusammenhang mit einem erhöhten Zelluntergang durch Apoptose als möglichen Mechanismus der frühen Toleranzentwicklung, der Histamingehalt ist dabei nicht signifikant verändert. Nach 6 Monaten war die Zellzahl jedoch wieder auf dem Level vor

der SIT, so dass, nach Ansicht von Nullens et al., die Wirkung der Therapie zu diesem Zeitpunkt auf den stark gesunkenen Histamingehalt der basophilen Granulozyten und die erniedrigte Histaminfreisetzung nach Aktivierung zurückzuführen sein könnte.<sup>108</sup>

#### 4.2.2 Generelle Unterschiede zu Vorstudien des HistaFlow

Wie in der als Vorlage dienenden Publikation wurden die zellulären Marker IgE und CD203c zur Identifikation der Basophilen genutzt. Ebo et al. verwendeten jedoch humanes Anti-IgE (Klon GE-1, Sigma Aldrich) gelabelt mit Alexa Fluor 405 (Invitrogen) und CD203c-APC (Klon H5C6, BD), während in dieser Arbeit monoklonaler Anti-IgE-FITC (Klon4H10, Sigma Aldrich) und Anti-CD203c-PE (Klon 97A6, BD) verwendet wurden. Als Aktivierungsmarker wurde jeweils CD63 eingesetzt, bei Ebo et al. CD63-FITC (Klon NP4D6, Biolegend), in dieser Arbeit PE-Cy7 CD63 (KlonH5C6, BD). Die Diaminoxidase wurde in beiden Arbeiten von BD bereitgestellt, bei Ebo et al. mit PE-, und in dieser Arbeit mit Horizon V500 konjugiert.

Da in dieser Arbeit der Flow CAST® als Standard des Basophilenaktivierungstest festgelegt wurde, wurde das HistaFlow-Protokoll teilweise daran angepasst und deswegen nicht Heparin, sondern EDTA als antikoagulierender Zusatz verwendet und der Aktivierungspuffer des Flow CAST® (mit 3 ng/ml Interleukin-3) genutzt. Zudem wurde das Mischverhältnis Blut, Antigen und Puffer teilweise variiert (Einzelheiten siehe Kapitel 2.4).

Bei der FACS-Analyse wurden bei Ebo et al. die Basophilen, die CD203c nach Aktivierung in den Positivkontrollen und im Allergenansatz hochregulierten, per se als aktivierte Zellen definiert, da in früheren Arbeiten über die Aktivierung der basophilen Granulozyten bei fehlender Hochregulierung der CD203c Expression auch keine Expression von CD63 nachgewiesen werden konnte.<sup>21,25,48,69</sup> Diese aktivierten Zellen wurden dann nach der Expressionsstärke von CD63 in 3 Subpopulationen unterteilt: CD203c<sup>bright+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD203c<sup>bright+</sup>CD63<sup>dim+</sup> (mittlere Expression) und CD203c<sup>bright+</sup>CD63<sup>bright+</sup> (starke Expression). Eine Histaminfreisetzung konnte allerdings nur bei der letzten Subpopulation nachgewiesen werden.<sup>48</sup> In dieser Arbeit wurde auf die Unterteilung in Subpopulationen verzichtet, aktivierte basophile Granulozyten wurden als CD203c positiv und CD63 positiv definiert.

#### 4.2.3 Beurteilung der Ergebnisse und mögliche Fehlerquellen

Bei der Beurteilung der erhobenen Daten für die Patienten- und Kontrollgruppe ist zunächst wieder die Größe der jeweiligen Gruppen mit 10 Patienten und 3 Kontrollen zu berücksichtigen. Insbesondere die Kontrollgruppe besitzt nur beispielhaften Charakter, eine

allgemein verbindliche Aussage zu treffen ist nur schwer möglich und in der Diskussion wird deshalb vornehmlich auf die Patientengruppe fokussiert. Insgesamt lässt sich dennoch auch anhand dieser geringen Fallzahl ersehen, dass die bisher publizierten Ergebnisse des HistaFlow zunächst nicht reproduziert werden konnten.

Die basophilen Granulozyten konnten mittels der zellulären Marker IgE und CD203c identifiziert werden, allerdings variierte die Größe der Zellpopulationen, teilweise auch in den 5 Ansätzen eines Probanden, stark. In der Patientengruppe war die Zellzahl in den Ansätzen der Positivkontrolle 1 und des Allergens deutlich niedriger als in den anderen Ansätzen, dies ließ sich in der Kontrollgruppe jedoch nicht beobachten. Im Vergleich mit den relativen Zellzahlen der anti-CD203c-PE/anti-IgE-FITC positiven Zellen des Protokolls „Zelluläre Marker“ (es wurde nicht zwischen Patienten und Kontrollen unterschieden) fiel auf, dass bei dem Protokoll zum intrazellulären Nachweis von Histamin bei der Patientengruppe in der Negativkontrolle, PBS-Kontrolle und Positivkontrolle 2 im Mittel 2-3fach höhere Zellzahlen gemessen wurden (siehe Kapitel 3.1.1 ). Die relativen Zellzahlen der Positivkontrolle 1 und des Allergenansatzes hingegen waren beinahe identisch und im Allergenansatz zeigte sich die höchste relative Zellzahl.

Mögliche Gründe für eine so große Streuung der Messwerte könnten theoretisch die Antikörper-Antigen-Reaktion der genutzten Antikörper Anti-IgE und Anti-CD203c, die Eigenschaften der daran gekoppelten Fluorochrome oder die Kompensationseinstellungen des FACS-Gerätes sein. Auch bei sorgfältiger Durchführung des Protokolls, können individuelle Schwankungen der Zellyse, der Waschschriffe oder der Bindungsreaktion während der Inkubation (Temperaturschwankungen) nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Aktivierung der basophilen Granulozyten wurde anhand der Expression von CD63 quantifiziert. Dabei wurde, wie in dem ersten Teil der Arbeit, der Antikörper PE-Cy7 CD63 (KlonH5C6, BD) verwendet. Die Aktivierung bei Patienten und Kontrollen insgesamt lag unter 50 %, in der Patientengruppe sogar unter 40 % (Positivkontrolle 1 34,2 %, Allergen 38,1 %). Bei der Positivkontrolle 2 mit fMLP war die Aktivierung noch geringer (unter 10 %). Die mittleren Aktivierungsraten der anti-CD203c-PE/anti-IgE-FITC positiven Zellen des Protokolls „Zelluläre Marker“ waren bei den Patienten mit 62,6 % in der Positivkontrolle 1 und 69,7 % im Allergenansatz beinahe doppelt so groß. Doch auch die Aktivierung in der Negativkontrolle war mit 35,8 % größer.

Die Auswertung der indirekten Messung des intrazellulären Histamins bzw. der Histaminfreisetzung anhand der, mit Horizon V500 konjugierten, Diaminoxidase zeigte, dass die intrazelluläre Färbung eventuell nur bedingt erfolgreich war. So war der Anteil der DAO

negativen und CD63 negativen Zellen (ohne Permeabilisierung) an der Gesamtzellzahl nicht nur bei der PBS-Kontrolle (über 90 %), sondern auch bei der Negativkontrolle (über 70 %) am höchsten und auch in den Positivkontrollen sowie im Allergenansatz waren diese Zellen in beträchtlichem Maße nachweisbar (siehe Abbildung 21).

Dennoch war ein Unterschied zwischen der Negativkontrolle (mit Triton X) und der PBS-Kontrolle (ohne Triton X) zu erkennen. So waren 25 % der Zellen der Negativkontrolle, aber weniger als 4 % der Zellen der PBS-Kontrolle DAO positiv und CD63 negativ, d.h. teilweise erfolgte eine intrazelluläre Färbung von Histamin. Auch 25-30 % der Zellen in den Positivkontrollen und dem Allergenansatz der Patientengruppe hatten diese Eigenschaften, allerdings war das Histamin damit in diesen Zellen auch nach Aktivierung noch intrazellulär nachweisbar. Dies ließe sich eventuell mit der niedrigen Aktivierungsrate von weniger als 40 % erklären. Doch immerhin im Mittel ca. 30 % der Basophilen der Positivkontrolle 1 und des Allergenansatzes der Patientengruppe waren als DAO negativ und CD63 positiv charakterisiert, was eine Histaminfreisetzung bei Aktivierung bedeuten könnte. Allerdings wären auch aktivierte Basophile, bei denen keine intrazelluläre Färbung erfolgt war, DAO negativ und CD63 positiv. Somit ist der Vergleich der Negativkontrolle mit der PBS-Kontrolle ausschlaggebend und dieser sprach, wie oben erläutert, eher gegen eine ausreichende Permeabilisierung und intrazelluläre Färbung.

Um mögliche Ursachen für die unzureichenden Ergebnisse des HistaFlows zu eruieren, erfolgte eine Kontaktaufnahme mit der Arbeitsgruppe Ebo und eine Zusammenarbeit in deren Labor in Antwerpen im Februar 2013. Nach ausführlichen Diskussionen mit Herrn Dr. C. H. Bridts, der an der Entwicklung des HistaFlow maßgeblich beteiligt war, sowie Durchführungen des HistaFlows in dessen Labor, wurden folgende mögliche Fehlerquellen diskutiert und untersucht.

#### **4.2.3.1 Zusatz des Vollbluts**

Um die Gerinnung des zu untersuchenden Blutes zu verhindern, wird es für den Basophilenaktivierungstest mit einem Zusatz, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) oder Heparin versetzt.<sup>28,47,47,49</sup> In dieser Arbeit wurde in Übereinstimmung mit dem Flow CAST®-Protokoll das Blut mit EDTA (1,6mg/ml Blut) gefüllten Monovetten abgenommen.

EDTA bildet Komplexe mit Metallen und entzieht so unter anderem das für die Gerinnungskaskade benötigte Calcium.<sup>35</sup> Ebo et al. nutzen hingegen Heparin als Antikoagulanzen für den HistaFlow, ein sulfatiertes Glukosaminoglykan, das Antithrombin III aktiviert und Faktor Xa und IXa hemmt.<sup>22</sup>

EDTA wird von der Arbeitsgruppe nicht verwendet, da Calcium, welches durch EDTA gebunden wird, ebenfalls eine Rolle bei den Aktivierungsprozessen in den Basophilen, sowohl bei der Mediatorfreisetzung, als auch bei der IL 4- und IL 13-Produktion, spielt.<sup>57, 89</sup> Dabei wird zunächst intrazelluläres Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (über Inositoltriphosphat) freigesetzt und dann ein sekundärer Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum über Ionenkanäle vermittelt.<sup>57,79</sup>

Da EDTA die Calciumkonzentration im Extrazellulärraum reduziert und somit die Aktivierung und Freisetzung von Histamin negativ beeinflussen könnte, nutzen Ebo et al. für den HistaFlow Heparin statt EDTA (persönliche Mitteilung Dr. Chris H. Bridts). Um den Calciumverlust wieder auszugleichen, versetzte Bühlmann den Flow CAST®-Aktivierungspuffer mit einer hohen Calciumkonzentration. Die Arbeitsgruppe Ebo ziehe jedoch vor, generell möglichst wenig in die normalen physiologischen Vorgänge einzugreifen (persönliche Mitteilung Dr. C. H. Bridts).

In Vergleichsversuchen wurde nach der Zusammenarbeit in Antwerpen auch in dieser Arbeit heparinisertes Blut für den HistaFlow verwendet, jedoch ohne Konsequenzen für die Aktivierung und das Gesamtbild der Messungen.

#### 4.2.3.2 Zusammensetzung der Puffer und Verhältnis von Blut, Puffer und Antigen

Für diese Arbeit wurde als Puffersubstanz der Aktivierungspuffer des Flow CAST® benutzt. Die Arbeitsgruppe Ebo setzt ihren Puffer nach einer selbstentwickelten Rezeptur selbst an (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammensetzung des Puffers (20 ml) nach Ebo et al. (persönliche Mitteilung)

Puffer 20 ml	
Inhaltsstoff	Volumen
Destilliertes Wasser	17,1 ml
HBSS	1,9 ml
Natriumhydrogencarbonat 7,5 % Lsg.	0,6 ml
HEPES	0,4 ml

Wichtiger als die Zusammensetzung der Puffer sei, nach Meinung von Herrn Dr. Chris H. Bridts, jedoch das Verhältnis des Blutvolumens zum entsprechenden Antigen (Allergen/fMLP/anti-FcεRI mAk) zum Puffer. Ebo et al. verwendeten 200 µl heparinisertes Vollblut und 200 µl Antigen bzw. 200 µl Puffer (für die Negativkontrolle).

Da in dieser Arbeit der Aktivierungspuffer sowie die Reagenzien der Positivkontrollen (fMLP, anti-FcεRI mAk) aus dem Flow CAST® und EDTA-Blut genutzt wurde, wurde es von der Arbeitsgruppe Ebo als elementar angesehen, die Substanzen, insbesondere wegen des Calciumverlustes durch EDTA, in demselben Verhältnis wie im Flow CAST® zu verwenden. Bei Vorversuchen, teilweise noch mit vorläufigen Protokollen, wurde jedoch deutlich, dass eine Reduktion auf 100 µl Antigen und 200 µl Puffer keinen Einfluss auf die Aktivierung des Basophilen zeigte, so dass, auch aus wirtschaftlichen Gründen, das endgültige Protokoll diese Volumina vorschrieb. Dennoch wurde nach Konsultation von Ebo et al. das Flow CAST®-Verhältnis angewandt auf das endgültige Protokoll und bei einem Patienten mit Gräserpollenallergie erneut getestet. Die Permeabilisierung war in diesem Versuch (siehe Abbildung 22, Versuch 1) verbessert, dieser Befund konnte jedoch bei einem anderen Patienten nicht in gleicher Weise reproduziert werden (Abbildung 22, Versuch 2). Dennoch ist auch in Versuch 2 eine marginale Verbesserung im Vergleich zu manchen Probanden ersichtlich. Zudem wurde in Versuch 2 eine Aktivierung von 73 % gemessen, deutlich höher als der Mittelwert der Patientengruppe (unter 40 %), allerdings gab es in dieser Gruppe auch vereinzelt Messwerte in dieser Höhe, so dass weitere Versuche nötig wären, um eine Überlegenheit des Flow CAST®-Verhältnisses zu prüfen.

#### 4.2.3.3 Die Wahl der Fluorochrome

Die technische Weiterentwicklung der Durchflusszytometer, sowohl der Hardware (Laser, Detektor-, und Filtersysteme) als auch der Analysesoftware, erlauben es mittlerweile, über 10 verschiedene Fluorochrome simultan zu messen. Die Wahl der passenden Fluorochrom-Kombinationen ist dabei, trotz des Einsatzes von verschiedenen Filtern und Kompensationsberechnungen, weiterhin entscheidend.

Fluorochrome sind kleine organische oder einzelne Protein-Moleküle, die kovalent an ein Protein gebunden werden können. Bei Fluorescein wird dafür beispielweise eine Isothiocyanat-Kette genutzt (Abkürzung FITC).<sup>112</sup> Fluorochrome sollten biologisch inaktiv sein, d.h. nicht mit den Zellen reagieren oder unspezifisch an ihnen binden (sog. „background binding“). Diese unspezifische Bindung wurde zum Beispiel für PE-Cy5 an B-Zellen von Mäusen mit autoimmunen Erkrankungen beschrieben.<sup>8</sup> Desweiteren ist eine hohe Fluoreszenzintensität („Helligkeit“), jedoch gleichzeitig eine geringe spektrale Überlappung („Spillover“) mit anderen Fluorochromen erstrebenswert.<sup>8,91,92</sup>

Als Maßeinheit für die Fluoreszenzintensität oder Helligkeit, die von dem jeweiligen Laser- und Filtersetting des genutzten FACS abhängig ist, kann der sogenannte Färbeindex („Stain Index“) herangezogen werden.<sup>8</sup> Dieser Index bezieht die möglichen Backgroundsignale, wie

Zellautofluoreszenz, unspezifische Färbung, elektronisches Rauschen und spektrale Überlappung von anderen Fluorochromen, die die Messbreite der Fluoreszenz einer ungefärbten Negativkontrolle bestimmen, mit ein. Der Stain Index kann als Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität von Fluorochrom-positiver und ungefärbter (negativer) Zellpopulation dividiert durch die doppelte Standardabweichung der ungefärbten (negativen) Zellpopulation berechnet werden (siehe Abbildung 25).

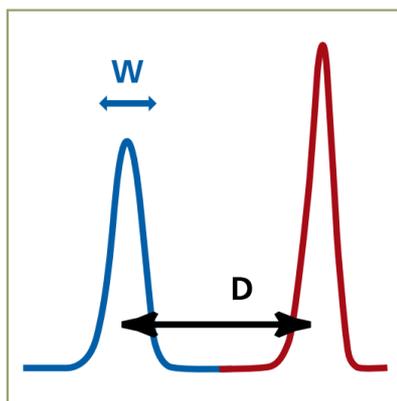


Abbildung 25: Berechnung des Stain Index:  $D/W$ .  $D$  entspricht der Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität von Fluorochrom-positiver und ungefärbter (negativer) Zellpopulation.  $W$  steht für die Streuung ( $2 \times SA$ ) der negativen Population<sup>10,91</sup>

Um die Färbeindexe zu vergleichen, wird derselbe Antikörper an die verschiedenen Fluorochrome konjugiert und in dem Durchflusszytometer gemessen.<sup>91,92</sup> Tabelle 12 zeigt beispielhaft als Orientierung die berechneten Färbeindizes, gemessen mit einem BD LSR II Zytometer sowie die Helligkeitsstufen der verwendeten Fluorochrome.

Tabelle 12: Stain Index und Helligkeit der Fluorochrome<sup>91</sup>

Fluorochrom	Stain Index	Helligkeit
PE	232	sehr hell
PE-Cy7	86	hell
Alexa Fluor 647	85	hell
PerCP-Cy5.5	82	hell
FITC	51	mittel
Horizon V450	42	mittel
Horizon V500	21	dunkel

Generell sollten schwach exprimierte zelluläre Strukturen mit stark fluoreszierenden Fluorochromen sichtbar gemacht werden, während zelluläre Marker mit hoher Expression

mit weniger hellen Fluorochromen markiert werden.<sup>8</sup> Allerdings muss, neben der Fluoreszenzintensität als Auswahlkriterium, auch die spektrale Überlappung der einzelnen Fluorochrome berücksichtigt werden.<sup>8</sup>

Diese kann zwar im Mittel für die Zellpopulation durch die rechnerische Kompensation in den entsprechenden Detektoren verhindert werden (siehe Kapitel 2.5.2), jedoch fallen individuelle Zellen unter oder über dieses Mittel, so dass weiterhin ein nicht kompensierter Streubereich bestehen bleibt. Dabei gilt, je höher die Fluoreszenzintensität eines Fluorochroms, je größer die Streuung der damit markierten Zellpopulation vor Kompensation und somit auch der nichtkompensierte Streubereich nach Kompensation. Zudem ist zu beachten, dass je höher die spektrale Überlappung zweier Fluorochrome ist, umso größer ist auch die Streubreite der kompensierten Zellpopulation und somit der nichtkompensierte Streubereich. Demnach muss immer zwischen Fluoreszenzintensität und spektraler Überlappung abgewogen werden.<sup>91,92</sup> Optimal sind Fluorochrome, die zwar eine hohe Fluoreszenzintensität, aber kaum spektrale Überlappung haben.

#### **4.2.3.3.1 PE und FITC**

Im HistaFlow wurde in dieser Arbeit für die Identifizierung der Basophilen Anti-IgE FITC und Anti-CD203c PE genutzt, zuvor erfolgte eine rechnerische Kompensation für diese beiden Fluorochrome. Allerdings ist die spektrale Überlappung von FITC und PE relativ hoch, so dass, auch nach der Kompensation, eine gewisse Streubreite an Zellen, die nicht kompensiert sind, erhalten bleibt. Verstärkt wird dieses Phänomen durch die hohe Fluoreszenzintensität von PE, da eine hohe Helligkeit der Zellpopulation mit einer größeren Streuung einhergeht. Somit werden FITC Signale trotz Kompensation auch im PE-Kanal gemessen.<sup>92</sup> CD203c, welches auf der Zellmembran nicht so stark exprimiert ist wie IgE, wird zwar mit dem helleren Fluorochrom (PE) detektiert, jedoch kann dieses eventuell nicht vom Spillover des mit FITC markierten IgE in den PE-Kanal unterschieden werden. Dies könnte die Schwierigkeiten der Identifizierung der basophilen Zellpopulation, sowie die große Streubreite der relativen Anzahl der Basophilen erklären und somit auch die Messung der DAO in dieser Zellpopulation erschweren bzw. verfälschen. Ocmant et al. nutzten in der bereits diskutierten Arbeit über den Vergleich von CD63 und CD203c als Aktivierungsmarker jedoch beispielsweise ebenfalls anti-IgE FITC und anti-CD203c-PE und beschrieben keine Probleme bei der Messung.<sup>109</sup> Ebo et al. nutzen jedoch, aus den oben aufgeführten Gründen diese Kombination nicht für den „HistaFlow“ (persönliche Mitteilung Dr. C.H. Britts).

#### 4.2.3.3.2 PE-Cy7

Für die Messung der Expression von CD63 als Marker für die Aktivierung, wurde ein Antikörper (Klon H5C6, BD) genutzt, der mit dem Fluorochrom PE-Cy7 konjugiert ist.

PE-Cy7 ist ein sogenanntes Tandem Fluorochrom aus Phycoerythrin (PE) und Indotricarbocyanin (Cy7). Die Fluorochrome Cy7 und Cy5 (Indodicarbocyanin) wurden von Waggoner et al. entwickelt, sie haben einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten und ein Emissionsmaximum über 600 nm im infraroten Bereich. Demnach ist die Fluoreszenzintensität dieser Fluorochrome sehr hoch und sie lassen sich deutlich von der Autofluoreszenz der Zellen unterscheiden<sup>102,133</sup>

Allerdings braucht man für die Anregung dieser Fluorochrome auch sehr hohe Wellenlängen und somit einen besonderen Laser. Konjugiert man jedoch PE mit Cy7 wird die Exzitationsenergie von PE (488 nm) in einem Prozess, der Resonanz-Energie-Transfer genannt wird, auf Cy7 übertragen. Die Emissionsenergie entspricht dann der von Cy7 (im infraroten Bereich bei 780 nm). Für diesen Prozess müssen die beiden Moleküle mit einem maximalen Abstand von 2-5 nm kovalent gebunden sein und das Emissionsspektrum des Donormoleküls (PE) muss mit dem Exzitationsspektrum des Akzeptormoleküls (Cy7) überlappen.<sup>61</sup> Somit wird kein weiterer Laser benötigt, man erhält jedoch neue Fluorochrome mit den oben genannten günstigen Eigenschaften für eine möglichst exakte Messung.<sup>121</sup>

Das Verhältnis von Donor- und Akzeptormolekül ist bei den Tandemfluorochromen entscheidend. Normalerweise variiert dieses von 1:3 bis 1:10. Es gilt, je höher die Anzahl des Akzeptors, je besser der Energietransfer, aber ab einem bestimmten Verhältnis kommt es zu einer Selbstausschöpfung des Akzeptors mit demzufolge geringerer Fluoreszenzintensität. Zudem werden die Fluorochrome „klebrig“, d.h. sie entwickeln unspezifische Bindungseigenschaften.<sup>71,121</sup> Auch die Kompensation der Tandemfluorochrome gegenüber den anderen Farbstoffen ist abhängig von dem Verhältnis der beiden Moleküle.<sup>8</sup>

Ein großer Nachteil der Tandemfluorochrome ist ihre Instabilität.<sup>71,85,91</sup> Die sogenannte Degradation der Moleküle, also die Lösung der kovalenten Bindung, entsteht unter anderem durch Photon-induzierte Oxidationsprozesse. Ist die Bindung aufgehoben, ist der Energie-Transfer nicht mehr möglich und die Fluorochrome emittieren in den Donorkanal (z.B. PE), was dort zu Fehlmessungen (falsch positiv) führt.<sup>91</sup> Hulspas et al. untersuchten die Degradation verschiedener Phycoerythrin-Tandem Fluorochrome in Raumlicht, wobei die höchste Degradationsrate bei den PE-Cy7 -Konjugaten gemessen wurde (11,3 %/h). Diese konnte jedoch bei einer Lichtreduktion auf 37 Lux (unter dunkler Flow Hood) auf 3,3 %/h und

bei 5 bzw. 0,5 Lux auf 0,4 %/h und 0,3 %/h gesenkt werden. Auch die Lang-Zeit-Stabilität bis zu 196 Tagen in soliden weißen Flakons (Degradation 0,9 %/Monat) bzw. bei besonderem Lichtschutz (Degradation 0,3 %/Monat) war bei PE-Cy7 am geringsten. Allerdings zeigte sich kein großer Einfluss dieser geringen Degradation, die trotz Lichtschutz erfolgte, auf die Kompensationsberechnungen und die Messung verschiedener, auch schwach exprimierter Zellmarker.<sup>71</sup>

Le Roy et al. hingegen stellten die Hypothese auf, dass die Degradation von Tandemfluorochromen, insbesondere APC-Cy7 auch einem Zell-abhängigen Mechanismus unterliege, da über eine gewisse Zeit bei Messungen verschiedener, mit APC-Cy7 konjugierter, Antikörper gegen CD45, zunehmend ein unspezifisches APC-Signal gemessen wurde, jedoch nicht bei den Kontroll-Beads. Zudem war die Degradation bei verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark und eine Zellfixierung, niedrige Temperaturen und der Zusatz von Natriumazid zur Reduktion des Zellmetabolismus reduzierten dieses unspezifische APC-Signal. Da auch der Zusatz von Wasserstoffperoxid und Vitamin C die Degradation verminderte, stellen die Autoren die Hypothese auf, freie Radikale seien beteiligt. Auch bei PE-Cy7 wurde eine solche Entkopplung des Tandemfluorochroms mit unspezifischem PE-Signal beschrieben, allerdings hatte Vitamin C nur einen geringen protektiven Effekt.<sup>85</sup>

In dieser Arbeit wurden die Zellen fixiert, nach Fertigstellung der Ansätze gekühlt und unter Lichtschutz aufbewahrt. Zudem enthielt der Puffer zur Resuspension der Zellpellets vor der FACS-Analyse Messung 0,1 % Natriumazid. Dennoch ist eine Degradation von CD63-PE-Cy7 nicht sicher auszuschließen. Ein solcher Prozess könnte somit ebenfalls zum einen Ursache für die erschwerte Identifikation der basophilen Granulozyten sein, da ein unspezifisches PE-Signal mit dem PE-Signal des Markers CD203c vermischt wäre. Zum anderen wäre es eine Erklärung für die teilweise niedrigen Aktivierungsraten in den Positivkontrollen und im Allergenansatz. Bei dem Protokoll „zelluläre Marker“ mit den gleichen Antikörpern waren die Aktivierungsraten jedoch deutlich höher. Ein anderer CD63-Antikörper als Vergleich wurde in dieser Arbeit jedoch noch nicht getestet.

#### **4.2.3.4 Konzentration der Antikörper**

Ein weiterer möglicher Teilgrund für die unzureichenden Messergebnisse könnten Fehlmessungen aufgrund zu hoher Konzentrationen der Antikörper sein (persönliche Mitteilung Herr Dr. C. H. Bridts), da auf das Erstellen einer Titrationskurve für jeden Antikörper zu Beginn verzichtet wurde. Stattdessen wurde jeweils ein festgesetztes Volumen von 10 µl Antikörper verwendet. Dies könnte falsch-positive Messungen aufgrund von sogenannten Backgroundsignalen durch unspezifische Färbung zellulärer Strukturen

auslösen. Aber auch Fehler in der Produktion der Antikörper-Fluorochrom-Verbindungen (z.B. suboptimales Antikörper-Fluorochrom-Verhältnis) führen dazu.<sup>8</sup> Allerdings wurden IgE-FITC und CD63-PE-Cy7 in Vergleichsversuchen in verschiedenen Verdünnungen getestet, wodurch sich aber keine Veränderung ergab. Letztendlich wurde im endgültigen Protokoll eine 1:40 Verdünnung verwendet.

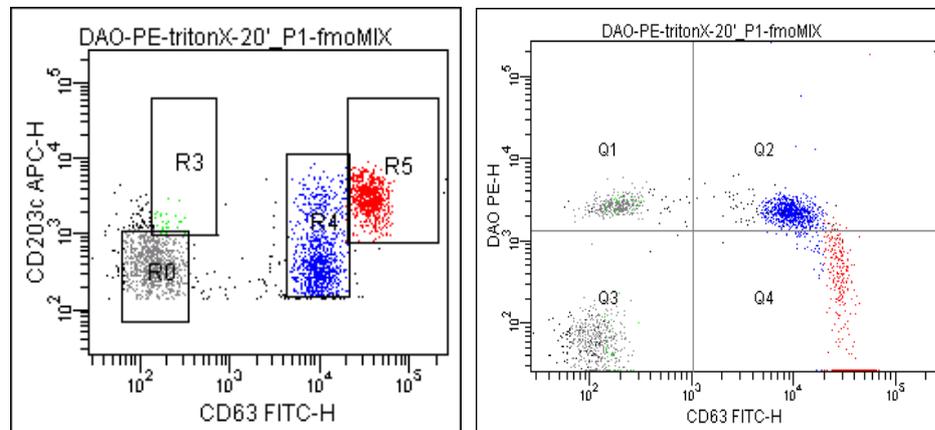
#### 4.2.3.5 Individuelle Kompensation für jeden Probanden

Die Kompensationseinstellungen für die genutzten Antikörper wurden vor Beginn der Messungen anhand von CompBeads von BD Biosciences (BD™CompBeads Anti-Rat Ig, κ (G16-510E3), Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set) durchgeführt. Diese Parameter wurden anschließend nicht mehr verändert, sondern für jeden Probanden angewendet. Die Arbeitsgruppe Ebo hingegen korrigierte, wegen einer möglichen basophilen Autofluoreszenz nach Aktivierung, bei jedem Patienten einzelne Kompensationswerte. Um diese auszugleichen, wurden immer 4 Kompensationsansätze nach folgendem Schema (Tabelle 13) angefertigt (persönliche Mitteilung Herr Dr. C.H. Bridts).

**Tabelle 13: Protokoll der 4 Kompensationsansätze zu Korrektur der Autofluoreszenz nach Ebo et al. (persönliche Mitteilung)**

	63-dao-	63-dao+	63++dao+	63++dao-
Puffer	200 µl	200 µl	200 µl	-
Anti-IgE (in dieser Arbeit Anti-FcεRI)	-	-	-	200 µl
Inkubation				
CD63	-	-	-	-
IgE/203c in	20 µl/10 µl	20 µl/10 µl	20 µl/10 µl	20 µl/10 µl
Fixierung mit Lyse/Fix Puffer				
Waschen mit PBS und 0.1 % TritonX				
TritonX	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
CD63	-	-	10 µl	10 µl
DAO	-	40 µl	40 µl	40 µl
Population bei korrekter Kompensation	graue Pop. Q3	graue Pop. Q1	blaue Pop. Q2	rote Pop. Q4

Die Populationen der Basophilen sollten sich bei korrekter Kompensation auf diese Weise verteilen (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Die Verteilung der basophilen Populationen der Kompensationsansätze nach korrigierter Kompensation bei Ebo et al. (persönliche Mitteilung) dunkelgrau DAO+/CD63- (Q1, entspricht Negativkontrolle), hellgrau DAO-/CD63- (Q3), blau DAO+/CD63++ (Q2), rot DAO-/CD63++ (Q4, entspricht Histaminrelease)

In Vergleichsversuchen wurden ebenfalls diese 4 Kompensationsansätze angefertigt und analysiert. Jedoch konnte die Verteilung, trotz Veränderung der Kompensationsparameter, nicht in gleicher Weise reproduziert werden (siehe Abbildung 24). Da das Prinzip der rechnerischen Kompensation jedoch allgemein gültig ist, lagen die Gründe dafür entweder bei der Wahl der Fluorochrome oder der Permeabilisierung der Zellen für die intrazelluläre Färbung.

#### 4.2.3.6 Zellpermeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100

Um das intrazellulär gespeicherte Histamin mit der Fluorochrom-gelabelten Diaminoxidase zu markieren, ist eine Permeabilisierung der basophilen Granulozyten erforderlich. In den publizierten Arbeiten über den HistaFlow wird dafür 0,1 % Triton X-100, gelöst in PBS, verwendet.<sup>48,108</sup>

Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches die Zellmembran auflöst, indem es Lipid-Detergenz- und Lipid-Detergenz-Protein-Micellen ausbildet. Für die Permeabilisierung werden Konzentrationen von 0,1 %-1 % Triton verwendet.<sup>83</sup> Das Molekül besitzt eine hydrophile Kopfgruppe aus Polyoxyethylenresten und eine lipophile Kette (siehe Abbildung 27), wobei es mit letzterer in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eindringt. Proteine werden jedoch im Allgemeinen nicht durch Triton X denaturiert.<sup>96</sup>

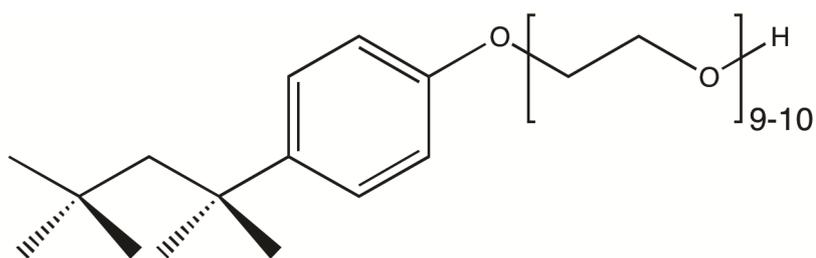


Abbildung 27: Strukturformel von Triton X-100 <sup>132</sup>

Während des Aufenthaltes in Antwerpen wurde bei Beispielversuchen mit Triton X aus dem dortigen Labor eine sehr gute intrazelluläre Färbung des Histamins erzielt.

Bei dieser Arbeit wurde Triton X-100 der Firma Sigma Aldrich als 0,1 % Lösung in PBS genutzt, welches auch von Herrn Dr. C.H. Bridts empfohlen wurde. Der PH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 titriert. Allerdings schien, nach Auswertung der erhobenen Daten, die Permeabilisierung der basophilen Granulozyten insgesamt nicht in gleichem Maße gelungen zu sein, wie in den publizierten Daten zum HistaFlow, was insbesondere der Vergleich der PBS- (ohne Permeabilisierung) und Negativkontrolle (mit Permeabilisierung) zeigte (siehe Abbildung 21).

Um die Permeabilisierung zu optimieren, wurden in Vorversuchen höhere Konzentrationen der Triton X-Lösung (0,25 %, 0,5 %, 5 %) verwendet, es zeigte sich jedoch keine Verbesserung der Permeabilisierung im Vergleich der PBS- und Negativkontrolle. Als alternative Permeabilisierungs-Methode wurde ein Saponin-Protokoll, das von Ebo et al. in einer Publikation über die kombinierte durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Signalen und Immunophänotypisierung von basophilen Granulozyten angewendet wurde, durchgeführt.<sup>49</sup> Dabei ließ sich jedoch ebenfalls keine bessere Permeabilisierung erreichen. Bei Versuchen mit dem BD Phosflow Perm Buffer II sowie BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus, zeigte sich eine komplette Zellzerstörung. Es ließ sich somit keine alternative Permeabilisierungsstrategie finden.

Die generelle zelllytische Wirkung von Triton X-100 wurde anhand einer Färbung mit Trypanblau in einem weiteren Experiment durchaus belegt, (siehe Kapitel und Kapitel), allerdings ließen sich nach der letzten Inkubationsphase, die auch in dem Protokoll zum intrazellulären Histaminnachweis enthalten ist, beinahe keine Zellfragmente mehr anfärben. Es wäre demnach möglich, dass die mit der DAO-Horizon V 500 markierten Zellen im letzten Waschschrift und Resuspensionsschrift verloren gehen. Allerdings war dies bei Ebo et al. in Anwendung des gleichen Protokolls nicht der Fall.

#### 4.2.4 Zusammenfassende Beurteilung der Fehlerquellen

Zusammenfassend ließ sich keine Verbesserung der intrazellulären Histaminmessung durch Heparin als Zusatz des Vollbluts, den von Ebo et al. verwendeten Puffer oder durch eine Veränderung der Antikörper-Konzentrationen erreichen. Die Modifizierung des Verhältnisses von Vollblut, Puffer und Antigen ergab Hinweise für eine höhere Permeabilisierung und Aktivierung, welche aber in weiteren Versuchen verifiziert werden müssten. Die individuelle Kompensationseinstellungen konnten nicht in gleicher Weise wie bei Ebo et al. reproduziert werden. Dies lag jedoch wohl am ehesten an der Wahl und Kombination der Fluorochrome aufgrund der hohen spektralen Überlappung von PE und FITC sowie den Eigenschaften des Tandemfluorochroms PE-Cy7. Die Fluorchromauswahl war die einzige Variable, die in Vergleichsversuchen nicht verändert und an das Protokoll von Ebo et al. angeglichen wurde, so dass sie als wahrscheinlichste Fehlerquelle anzusehen ist und in weiteren Versuchen analysiert werden müsste. Die Permeabilisierung durch Triton-X 100 wurde nicht anders als bei Ebo et al. durchgeführt, so dass ein Verlorengelassen der Zellen im letzten Waschschrift nur schwer zu erklären wäre.

## 5 Zusammenfassung

Der Basophilenaktivierungstest ermöglicht die *in vitro* Analyse und Quantifizierung der Aktivierung basophiler Granulozyten durch spezifische Allergene mittels Durchflusszytometrie. Dabei erfolgt sowohl die Identifizierung der Basophilen, als auch die Messung der Aktivierung durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper gegen spezifische zelluläre Marker auf der Zellmembran. Einsatz findet der Basophilenaktivierungstest in Fällen, wo die klinisch etablierten Methoden der Typ-I-Allergiediagnostik, wie Anamneseerhebung, Hauttestungen (Prick- oder Intrakutan-Test), Provokationstestungen und Bestimmung des spezifischen IgE, keine eindeutige Diagnosefindung erlauben. Als Marker der Aktivierung werden entweder das Tetraspanin CD63, welches nur auf der Zelloberfläche der aktivierten Basophilen exprimiert wird, oder CD203c wegen seiner stark hochregulierten Expression nach Aktivierung genutzt. Für die Identifizierung stehen verschiedene Marker zur Verfügung, zum Beispiel CCR3 (CD193), IgE, CD203c, CRTH2/CD3 oder HLA-DR/CD123. Im Jahr 2011 wurde eine Methodik publiziert, bei der der reguläre Basophilenaktivierungstest mit der indirekten Messung des intrazellulären Histamins bzw. der Histaminfreisetzung kombiniert wird (HistaFlow). Dies erfolgt mit Hilfe einer Fluorochrom-konjugierten Diaminoxidase, die nach Permeabilisierung der Zellen durch Triton X-100 an Histamin bindet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie die Identifizierungsmarker anti-CCR3-Alexa Fluor 647, anti-IgE-FITC, anti-CRTH2-Horizon V450 und anti-CD203c-PE sowie verschiedene Kombinationen, u.a. mit anti-CD3-PerCP-Cy5.5, in Hinblick auf die relative Zellzahl der identifizierten Zellpopulation, ihrer Kontamination mit Nichtbasophilen und ihrer Aktivierung (Aktivierungsmarker anti-CD63-PE-Cy7) untersucht. Als BAT-Standard wurde der Flow CAST® der Firma Bühlmann Laboratories AG vergleichend hinzugezogen. Ziel des zweiten Teils der Arbeit war die Etablierung des HistaFlows als neues Verfahren für die funktionelle intrazelluläre Histaminmessung.

Die Patientengruppe der Studie umfasste 10 Personen mit Gräserpollenallergie, sowie 3 gesunde Kontrollen. Der Flow CAST® wurde gemäß des Protokolls der Firma Bühlmann Laboratories AG durchgeführt. Für das Protokoll der zellulären Marker und der intrazellulären Histaminmessung wurden der Aktivierungspuffer und die Positivkontrollen des Flow CAST® verwendet, die Zellyse erfolgte jedoch, in Anlehnung an die erste Publikation des HistaFlows., mit dem Phosflow Lyse/Fix X5 von BD und die finale Resuspension der Zellen mit 0,1 % Natriumazidlösung. Das Protokoll der zellulären Marker orientierte sich am Flow

CAST®, das Protokoll zur intrazellulären Histaminmessung wurde entsprechend der allgemeinen Vorgaben des HistaFlows, jedoch mit EDTA- statt heparinisierem Blut, durchgeführt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte durch das FACS BD LSRFortessa™.

Beim Vergleich der zellulären Identifizierungsmarker fiel auf, dass die CCR3<sup>+</sup>-Population (Nachweis mit Alexa-Fluor 647 anti-CD193) in fast allen Ansätzen die höchste relative Zellzahl aufwies, gefolgt von den IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup> (Nachweis durch FITC und PE) und IgE<sup>-</sup>-Populationen. Die CCR3<sup>+</sup>-Population, die mit anti-CCR3-PE aus dem Flow CAST® nachgewiesen wurde, war jedoch im Vergleich deutlich größer. Die kleinsten Zellpopulationen wurden anhand der Kombination CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD203c<sup>+</sup> erfasst. Die Zellpopulationen von CD203c<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CCR3<sup>+</sup>/CD203c<sup>+</sup> und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD203c<sup>+</sup> waren, in Anbetracht der Konkordanzanalyse vermutlich Teilmengen der CCR3<sup>+</sup>-Population. Die IgE<sup>+</sup>/CD203c<sup>-</sup>, IgE<sup>-</sup>, CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>-</sup> und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Zellen waren jedoch nicht in gleichem Maße konkordant, was auf eine Kontamination mit Nichtbasophilen in bestimmten Populationen schließen ließ.

Die Kontamination der CCR3<sup>+</sup>-Zellen mit CD3<sup>+</sup>-Zellen war in dieser Arbeit im Mittel 12,6 %. Beim Vergleich der Kontamination der CCR3<sup>+</sup>-Population (41,9 %) und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-Population mit CD203<sup>-</sup>-Zellen (45,6 %) zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Bemerkenswert war ebenso, dass die IgE<sup>-</sup>-Population, anders als teilweise in der Literatur beschrieben, eine sehr geringe Kontamination, sowohl mit CCR3<sup>-</sup>-Zellen (im Mittel 14,8 %), als auch mit CD203c<sup>-</sup>-Zellen (im Mittel 19,6 %, signifikant niedriger als bei CCR3 und CRTH2/CD3<sup>-</sup>) aufwies. Somit war führte die Markierung mit anti-IgE zur reinsten Basophilen-Population. Allerdings konnte aufgrund der kleinen Kontrollgruppe keine Aussage bezüglich der Variabilität vorallem bei den Atopikern getroffen werden und es wurden nicht die Varianten CCR3<sup>+</sup>/IgE<sup>-</sup>, CD203c<sup>+</sup>/IgE<sup>-</sup> und CRTH2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/IgE<sup>-</sup> betrachtet. Die Kontamination von CCR3<sup>+</sup>-Zellen mit CD3<sup>+</sup> erschien vernachlässigbar, anti-CD203c erwies sich jedoch als wichtiger Kombinationsmarker für anti-CCR3, anti-IgE und anti-CRTH2/anti-CD3.

Bei der Messung der Aktivierung anhand von anti-CD63-PE-Cy7 wurden mit CD203c und dessen Kombinationen im Vergleich zu den anderen Markern wie z.B. CCR3 und seinen Kombinationen zu hohe Messungen in den Negativkontrollen gemessen, was zunächst die Beurteilung der basophilen Aktivierung nach Stimulation einschränkt. Bei Betrachtung der Deltawerte zeigten jedoch CD203c und dessen Kombinationen die höchstem Werte, das heißt, die Aktivierung in den Positivkontrollen und Allergen war stärker als zum Beispiel bei CCR3. Der Flow CAST® ergab im Mittel wiederum die höchsten Aktivierungsraten.

Bei der Etablierung der intrazellulären Histaminmessung konnten die publizierten Ergebnisse zunächst nicht in gleichem Maße reproduziert werden. So war die Variabilität der Zellzahl bei der Identifizierung der basophilen Granulozyten mit anti-IgE-FITC und anti-CD203c-PE sehr hoch und die Aktivierung lag im Mittel unter 50 %. Allerdings fehlen für diese Parameter bei dem Protokoll für intrazelluläre Histaminmessung publizierte Vergleichswerte. Die Auswertung der indirekten Messung des intrazellulären Histamins bzw. der Histaminfreisetzung anhand der mit Horizon V500 konjugierten Diaminoxidase, erbrachte enttäuschende Ergebnisse. So war der Anteil der DAO negativen und CD63 negativen Zellen an der Gesamtzellzahl nicht nur bei der PBS-Kontrolle (ohne Permeabilisierung) mit über 90 %, sondern auch (mit Permeabilisierung) bei der Negativkontrolle mit über 70 % am höchsten und auch in den Positivkontrollen sowie im Allergenansatz waren diese Zellen in beträchtlichem Maße nachweisbar. Dennoch war ein Unterschied zwischen der Negativkontrolle (mit Permeabilisierung durch Triton X-100) und der PBS-Kontrolle (ohne Permeabilisierung durch Triton X-100) zu erkennen. So waren 25 % der Zellen der Negativkontrolle, aber weniger als 4 % der Zellen der PBS-Kontrolle DAO positiv und CD63 negativ, d.h. teilweise erfolgte eine intrazelluläre Färbung. Auch 25-30 % der Zellen in den Positivkontrollen und dem Allergenansatz der Patientengruppe hatten diese Eigenschaften, allerdings war das Histamin damit in diesen Zellen auch nach Aktivierung noch intrazellulär nachweisbar. Dies ließe sich eventuell mit der niedrigen Aktivierungsrate von weniger als 40 % erklären. Doch immerhin waren im Mittel ca. 30 % der Basophilen der Positivkontrolle 1 und des Allergenansatzes der Patientengruppe als DAO negativ und CD63 positiv charakterisiert, was eine Histaminfreisetzung bei Aktivierung bedeuten könnte.

Verschiedene mögliche Ursachen für diese Ergebnisse, wie der Einfluss des EDTA und des verwendeten Puffers, eine mögliche individuelle Autofluoreszenz der basophilen Granulozyten sowie eine unzureichende Permeabilisierung durch Triton X, wurden untersucht und weitgehend ausgeschlossen. Auch eine Anpassung des Verhältnisses Blut/Puffer/Antigen erbrachte keine reproduzierbare Veränderung für die indirekte Messung des Histamins, allerdings zeigte sich eine bessere Aktivierung. Schließlich könnte jedoch die Wahl der Fluorochrome für die Antikörper CD203c, IgE und CD63 mit PE, FITC und PE-Cy7, als auch deren Konzentrationen eine große Rolle spielen. Zum einen könnten Degradierungsprozesse des Tandem-Fluorochroms PE-Cy7 zu einem unspezifischen PE-Signal führen, das sich mit dem Signal von CD203c-PE vermischen würde und zum anderen könnte die große spektrale Überlappung von PE und FITC die korrekte Identifizierung der Basophilen erschweren.

## *Zusammenfassung*

---

Zusammenfassend ist für die zukünftige Arbeit mit dem HistaFlow der Versuch einer anderen Fluorochrom-Kombination (z.B. wie bei Ebo et al. anti-CD203c-APC, anti-CD63-FITC, anti-IgE-Alexa Fluor 405) mit vorheriger Titration der Antikörper sowie möglicherweise eine Anpassung des Verhältnisses Blut/Puffer/Antigen zu empfehlen.

## 6 Literaturverzeichnis

- (1) Abe, Y., Ogino, S., Irifune, M., Imamura, I., Fukui, H., Wada, H., and Matsunaga, T.  
Histamine content, synthesis and degradation in human nasal mucosa.  
*Clin.Exp.Allergy.* 23 (1993) 132-136
- (2) Abuaf, N., Rostane, H., Rajoely, B., Gaouar, H., Autegarden, J. E., Leynadier, F., and Girot, R.  
Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy.  
*Clin.Exp.Allergy.* 38 (2008) 921-928
- (3) Akdis, C. A. and Blaser, K.  
Histamine in the immune regulation of allergic inflammation.  
*J.Allergy Clin.Immunol.* 112 (2003) 15-22
- (4) Altman, DG.  
"Practical Statistics for Medical Research"  
Chapman&Hall, Boca Raton, 1991
- (5) Anselmino, L. M., Perussia, B., and Thomas, L. L.  
Human basophils selectively express the Fc gamma RII (CDw32) subtype of IgG receptor.  
*J.Allergy Clin.Immunol.* 84 (1989) 907-914
- (6) Arock, M., Schneider, E., Boissan, M., Tricottet, V., and Dy, M.  
Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions.  
*J.Leukoc.Biol.* 71 (2002) 557-564
- (7) Baumer, W. and Rossbach, K.  
Histamine as an immunomodulator.  
*J.Dtsch.Dermatol.Ges.* 8 (2010) 495-504
- (8) Baumgarth, N. and Roederer, M.  
A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping.  
*J.Immunol.Methods.* 243 (2000) 77-97
- (9) Bavbek, S., Ikinogullari, A., Dursun, A. B., Guloglu, D., Arikan, M., Elhan, A. H., and Misirligil, Z.  
Upregulation of CD63 or CD203c alone or in combination is not sensitive in the diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance.

- Int.Arch.Allergy Immunol. 150 (2009) 261-270
- (10) BD Biosciences  
BD Biosciences Fluorochrome Reference Chart 2012  
[http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor\\_Fluorochrome\\_Guide.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_Fluorochrome_Guide.pdf)  
Stand: 17-4-2013
- (11) BD Biosciences  
BD Multicolor Antibody Reagents Catalog 9th Edition  
[www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor\\_catalog\\_human\\_mouse\\_non-human.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_catalog_human_mouse_non-human.pdf)  
Stand: 17-4-2013
- (12) BD Biosciences Deutschland  
"Training-Handbuch Durchflusszytometrie FACSCalibur"  
BD Deutschland, 1-3-1999 , S.1-5
- (13) Biedermann, T.  
Grundlagen von Allergie- und Intoleranzreaktionen.  
In: Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Plewig, G., Landthaler, M., Burgdorf, W. H. C., Hertl, M., and Ruzicka, T. (Hrsg.) Springer, Berlin Heidelberg, 2012, S.413
- (14) Binder, M., Fierlbeck, G., King, Ti, Valent, P., and Bühring, H. J.  
Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 129 (2002) 160-168
- (15) Bollen, M., Gijssbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Stefan, C.  
Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move.  
Crit Rev.Biochem.Mol.Biol. 35 (2000) 393-432
- (16) Boucheix, C. and Rubinstein, E.  
Tetraspanins.  
Cell Mol.Life Sci. 58 (2001) 1189-1205
- (17) Boumiza, R., Debard, A. L., and Monneret, G.  
The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives.  
Clin.Mol.Allergy. 3 (2005) 9
- (18) Boumiza, R., Monneret, G., Forissier, M. F., Savoye, J., Gutowski, M. C., Powell, W. S., and Bienvenu, J.

- Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63.  
Clin.Exp.Allergy. 33 (2003) 259-265
- (19) Bühlmann  
"Flow CAST® Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry"  
Bühlmann, Schönenbuch, 2011
- (20) Bühring, H. J., Simmons, P. J., Pudney, M., Müller, R., Jarrossay, D., van, Agthoven A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P., and Kanz, L.  
The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors.  
Blood. 94 (1999) 2343-2356
- (21) Bühring, H. J., Streble, A., and Valent, P.  
The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 133 (2004) 317-329
- (22) Burgis, E.  
"Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pharmakologie"  
Elsevier Health Sciences Germany, München Jena, 2008 , S.238-239
- (23) Carter, N. P. and Ormerod, M. G.  
Introduction to the principles of flow cytometry.  
In: Flow Cytometry: A Practical Approach.Ormerod, M. G. (Hrsg.) OUP Oxford, Oxford New York, 2000, 3rd Auflage. S.13-15
- (24) Chirumbolo, S., Ortolani, R., and Vella, A.  
CCR3 as a single selection marker compared to CD123/HLADR to isolate basophils in flow cytometry: some comments.  
Cytometry A. 79 (2011) 102-106
- (25) Chirumbolo, S., Vella, A., Ortolani, R., De, Gironcoli M., Solero, P., Tridente, G., and Bellavite, P.  
Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach.  
Clin.Mol.Allergy. 6 (2008) 12
- (26) Crockard, A. D. and Ennis, M.  
Basophil histamine release tests in the diagnosis of allergy and asthma.  
Clin.Exp.Allergy. 31 (2001) 345-350
- (27) Dale, H. H. and Laidlaw, P. P.  
The physiological action of beta-aminazolyethylamine.

- J.Physiol. 41 (1910) 318-344
- (28) de Weck, A. L., Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Aberer, W., Bienvenu, J., Blanca, M., Demoly, P., Ebo, D. G., Mayorga, L., Monneret, G., and Sainte-Laudy, J.  
Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 146 (2008) 177-189
- (29) De Week, A. L., Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Aberer, W., Sturm, G., Bilo, M. B., Montroni, M., Blanca, M., Torres, M. J., Mayorga, L., Campi, P., Manfredi, M., Drouet, M., Sainte-Laudy, J., Romano, A., Merk, H., Weber, J. M., and Jermann, T. M.  
Diagnosis of immediate-type beta-lactam allergy in vitro by flow-cytometric basophil activation test and sulfidoleukotriene production: a multicenter study.  
J.Investig.Allergol.Clin.Immunol. 19 (2009) 91-109
- (30) De, Swerd A., Van Den Keybus, C., Kasran, A., Cadot, P., Neyens, K., Coorevits, L., Kochuyt, A. M., Degreef, H., and Ceuppens, J. L.  
Detection of basophil-activating IgG autoantibodies in chronic idiopathic urticaria by induction of CD 63.  
J.Allergy Clin.Immunol. 116 (2005) 662-667
- (31) Deissler, H., Lottspeich, F., and Rajewsky, M. F.  
Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130RB13-6 reveals relationship to human and murine PC-1.  
J.Biol.Chem. 270 (1995) 9849-9855
- (32) Demetrick, D. J., Herlyn, D., Tretiak, M., Creasey, D., Clevers, H., Donoso, L. A., Vennegoor, C. J., Dixon, W. T., and Jerry, L. M.  
ME491 melanoma-associated glycoprotein family: antigenic identity of ME491, NKI/C-3, neuroglandular antigen (NGA), and CD63 proteins.  
J.Natl.Cancer Inst. 84 (1992) 422-429
- (33) Demoly, P., Lebel, B., and Arnoux, B.  
Allergen-induced mediator release tests.  
Allergy. 58 (2003) 553-558
- (34) Demoly, P., Lebel, B., Messaad, D., Sahla, H., Rongier, M., Daures, J. P., Godard, P., and Bousquet, J.  
Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy.  
Allergy. 54 (1999) 500-506
- (35) Dörner, K.  
"Taschenlehrbuch klinische Chemie und Hämatologie"  
Thieme, Stuttgart New York, 2013 , S.10
- (36) Ducrest, S., Meier, F., Tschopp, C., Pavlovic, R., and Dahinden, C. A.

- Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers.  
Allergy. 60 (2005) 1446-1450
- (37) Dulkys, Y., Kluthe, C., Buschermohle, T., Barg, I., Knoss, S., Kapp, A., Proudfoot, A. E., and Elsner, J.  
IL-3 induces down-regulation of CCR3 protein and mRNA in human eosinophils.  
J.Immunol. 167 (2001) 3443-3453
- (38) Dvorak, A. M., Costa, J. J., Morgan, E. S., Monahan-Earley, R. A., and Galli, S. J.  
Diamine oxidase-gold ultrastructural localization of histamine in human skin biopsies containing mast cells stimulated to degranulate in vivo by exposure to recombinant human stem cell factor.  
Blood. 90 (1997) 2893-2900
- (39) Dvorak, A. M., MacGlashan, D. W., Jr., Morgan, E. S., and Lichtenstein, L. M.  
Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils.  
Blood. 88 (1996) 4090-4101
- (40) Dvorak, A. M., Morgan, E. S., Lichtenstein, L. M., and MacGlashan, D. W., Jr.  
Activated human basophils contain histamine in cytoplasmic vesicles.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 105 (1994) 8-11
- (41) Dvorak, A. M., Morgan, E. S., Schleimer, R. P., and Lichtenstein, L. M.  
Diamine oxidase-gold labels histamine in human mast-cell granules: a new enzyme-affinity ultrastructural method.  
J.Histochem.Cytochem. 41 (1993) 787-800
- (42) Dy, M. and Schneider, E.  
Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis.  
Cytokine Growth Factor Rev. 15 (2004) 393-410
- (43) Eberlein, B.  
Basophil activation test in the diagnosis of insect venom allergies.  
Clin.Exp.Allergy. 39 (2009) 1633-1634
- (44) Eberlein, B., Leon Suarez, I., Darsow, U., Rueff, F., Behrendt, H., and Ring, J.  
A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics.  
Clin.Exp.Allergy. 40 (2010) 411-418
- (45) Eberlein-König, B., Schmidt-Leidescher, C., Rakoski, J., Behrendt, H., and Ring, J.  
In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy.  
J.Investig.Allergol.Clin.Immunol. 16 (2006) 5-10

- (46) Eberlein-König, B., Varga, R., Mempel, M., Darsow, U., Behrendt, H., and Ring, J.  
Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy.  
*Allergy*. 61 (2006) 1084-1085
- (47) Ebo, D. G., Bridts, C. H., Hagendorens, M. M., Aerts, N. E., De Clerck, L. S., and Stevens, W. J.  
Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology.  
*Cytometry B Clin.Cytom.* 74 (2008) 201-210
- (48) Ebo, D. G., Bridts, C. H., Mertens, C. H., Hagendorens, M. M., Stevens, W. J., and De Clerck, L. S.  
Analyzing histamine release by flow cytometry (HistaFlow): a novel instrument to study the degranulation patterns of basophils.  
*J.Immunol.Methods*. 375 (2012) 30-38
- (49) Ebo, D. G., Dombrecht, E. J., Bridts, C. H., Aerts, N. E., De Clerck, L. S., and Stevens, W. J.  
Combined analysis of intracellular signalling and immunophenotype of human peripheral blood basophils by flow cytometry: a proof of concept.  
*Clin.Exp.Allergy*. 37 (2007) 1668-1675
- (50) Ebo, D. G., Hagendorens, M. M., Bridts, C. H., Schuerwegh, A. J., De Clerck, L. S., and Stevens, W. J.  
In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow?  
*Clin.Exp.Allergy*. 34 (2004) 332-339
- (51) Ebo, D. G., Hagendorens, M. M., Schuerwegh, A. J., Beirens, L. M., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., and Stevens, W. J.  
Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy.  
*Cytometry B Clin.Cytom.* 72 (2007) 196-203
- (52) Ebo, D. G., Lechkar, B., Schuerwegh, A. J., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., and Stevens, W. J.  
Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy.  
*Allergy*. 57 (2002) 706-712
- (53) Ebo, D. G., Sainte-Laudy, J., Bridts, C. H., Mertens, C. H., Hagendorens, M. M., Schuerwegh, A. J., De Clerck, L. S., and Stevens, W. J.  
Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives.  
*Allergy*. 61 (2006) 1028-1039
- (54) Ehrlich, P.

- Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen.  
Arch Anat Physiol. 3 (1879) 166-169
- (55) Endo, Y.  
Simultaneous induction of histidine and ornithine decarboxylases and changes in their product amines following the injection of Escherichia coli lipopolysaccharide into mice.  
Biochem.Pharmacol. 31 (1982) 1643-1647
- (56) Erdmann, S. M., Sachs, B., Kwiecien, R., Moll-Slodowy, S., Sauer, I., and Merk, H. F.  
The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy.  
Allergy. 59 (2004) 1102-1109
- (57) Falcone, F. H., Haas, H., and Gibbs, B. F.  
The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses.  
Blood. 96 (2000) 4028-4038
- (58) Falcone, F. H., Zillikens, D., and Gibbs, B. F.  
The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity.  
Exp.Dermatol. 15 (2006) 855-864
- (59) Fureder, W., Schernthaner, G. H., Ghannadan, M., Hauswirth, A., Sperr, W. R., Semper, H., Majlesi, Y., Zwirner, J., Gotze, O., Buhning, H. J., Lechner, K., and Valent, P.  
Quantitative, phenotypic, and functional evaluation of basophils in myelodysplastic syndromes.  
Eur.J.Clin.Invest. 31 (2001) 894-901
- (60) Ghannadan, M., Hauswirth, A. W., Schernthaner, G. H., Muller, M. R., Klepetko, W., Schatzl, G., Sperr, W. R., Buhning, H. J., and Valent, P.  
Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 127 (2002) 299-307
- (61) Glazer, A. N. and Stryer, L.  
Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. Emission wavelength shifting by energy transfer.  
Biophys.J. 43 (1983) 383-386
- (62) Goding, J. W., Grobber, B., and Slegers, H.  
Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family.  
Biochim.Biophys.Acta. 1638 (2003) 1-19

- (63) Griese, M., Kusenbach, G., and Reinhardt, D.  
Histamine release test in comparison to standard tests in diagnosis of childhood allergic asthma.  
Ann.Allergy. 65 (1990) 46-51
- (64) Grouven, U., Bender, R, Ziegler, A., and Lange, S.  
Vergleich von Messmethoden -Artikel Nr. 24 der Statistik-Serie in der DMW-  
Dtsch Med Wochenschr. 132 (2007) e69-e73
- (65) Hausmann, O. V., Gentinetta, T., Fux, M., Ducrest, S., Pichler, W. J., and Dahinden, C. A.  
Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry.  
Allergy. 66 (2011) 85-91
- (66) Hauswirth, A. W., Natter, S., Ghannadan, M., Majlesi, Y., Schernthaner, G. H., Sperr, W. R., Buhring, H. J., Valenta, R., and Valent, P.  
Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals.  
J.Allergy Clin.Immunol. 110 (2002) 102-109
- (67) Hauswirth, A. W., Sonneck, K., Florian, S., Krauth, M. T., Bohm, A., Sperr, W. R., Valenta, R., Schernthaner, G. H., Printz, D., Fritsch, G., Buhring, H. J., and Valent, P.  
Interleukin-3 promotes the expression of E-NPP3/CD203C on human blood basophils in healthy subjects and in patients with birch pollen allergy.  
Int.J.Immunopathol.Pharmacol. 20 (2007) 267-278
- (68) Hemery, M. L., Arnoux, B., Dhivert-Donnadieu, H., Rongier, M., Barbotte, E., Verdier, R., and Demoly, P.  
Confirmation of the diagnosis of natural rubber latex allergy by the Basotest method.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 136 (2005) 53-57
- (69) Hennersdorf, F., Florian, S., Jakob, A., Baumgartner, K., Sonneck, K., Nordheim, A., Biedermann, T., Valent, P., and Buhring, H. J.  
Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation.  
Cell Res. 15 (2005) 325-335
- (70) Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R. P., Tsujimoto, Y., Croce, C. M., and Koprowski, H.  
Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression.  
Cancer Res. 48 (1988) 2955-2962
- (71) Hulspas, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Douglas, D., Kildew-Shah, B., and Gilbert, J.  
Flow cytometry and the stability of phycoerythrin-tandem dye conjugates.

- Cytometry A. 75 (2009) 966-972
- (72) Ishizaka, T., De, Bernardo R., Tomioka, H., Lichtenstein, L. M., and Ishizaka, K.  
Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release.  
J.Immunol. 108 (1972) 1000-1008
- (73) Jin-Hua, P., Goding, J. W., Nakamura, H., and Sano, K.  
Molecular cloning and chromosomal localization of PD-Ibeta (PDNP3), a new member of the human phosphodiesterase I genes.  
Genomics. 45 (1997) 412-415
- (74) Jutel, M., Akdis, M., and Akdis, C. A.  
Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology.  
Clin.Exp.Allergy. 39 (2009) 1786-1800
- (75) Kepley, C. L., Cambier, J. C., Morel, P. A., Lujan, D., Ortega, E., Wilson, B. S., and Oliver, J. M.  
Negative regulation of FcepsilonRI signaling by FcgammaRII costimulation in human blood basophils.  
J.Allergy Clin.Immunol. 106 (2000) 337-348
- (76) Kepley, C. L., Youssef, L., Andrews, R. P., Wilson, B. S., and Oliver, J. M.  
Syk deficiency in nonreleaser basophils.  
J.Allergy Clin.Immunol. 104 (1999) 279-284
- (77) Kim, M. S. and Cho, Y. J.  
Flow cytometry-assisted basophil activation test as a safe diagnostic tool for aspirin/NSAID hypersensitivity.  
Allergy Asthma Immunol.Res. 4 (2012) 137-142
- (78) Kirshenbaum, A. S., Goff, J. P., Kessler, S. W., Mican, J. M., Zsebo, K. M., and Metcalfe, D. D.  
Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells.  
J.Immunol. 148 (1992) 772-777
- (79) Kleine-Tebbe, J., Erdmann, S., Knol, E. F., MacGlashan, D. W., Jr., Poulsen, L. K., and Gibbs, B. F.  
Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 141 (2006) 79-90
- (80) Knol, E. F., Mul, F. P., Jansen, H., Calafat, J., and Roos, D.  
Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435.  
J.Allergy Clin.Immunol. 88 (1991) 328-338
- (81) Kostenis, E. and Ulven, T.

- Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation.  
Trends Mol.Med. 12 (2006) 148-158
- (82) Koyama, Y., Suzuki, M., and Yoshida, T.  
CD63, a member of tetraspan transmembrane protein family, induces cellular spreading by reaction with monoclonal antibody on substrata.  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 246 (1998) 841-846
- (83) Larsen, K. L.  
Measurement of cytoplasmic and nuclear antigens.  
In: Flow Cytometry: A Practical Approach.Ormerod, M. G. (Hrsg.) OUP Oxford, Oxford New York, 2000, 3rd Auflage. S.136
- (84) Lavens-Phillips, S. E. and MacGlashan, D. W., Jr.  
The tyrosine kinases p53/56lyn and p72syk are differentially expressed at the protein level but not at the messenger RNA level in nonreleasing human basophils.  
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 23 (2000) 566-571
- (85) Le, Roy C., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Letestu, R.  
Flow cytometry APC-tandem dyes are degraded through a cell-dependent mechanism.  
Cytometry A. 75 (2009) 882-890
- (86) Li, T. M., Kontis, K. J., Rance, F., Abbal, M., and Vuitton, D. A.  
Clinical evaluation of a new fully automated enzyme immunoassay for basophil histamine release in whole blood.  
Inflamm.Res. 49 Suppl 1 (2000) S49-S50
- (87) Lichtenstein, L. M., Norman, P. S., and Connell, J. T.  
Comparison between skin-sensitizing antibody titers and leukocyte sensitivity measurements as an index of the severity of ragweed hay fever.  
J.Allergy. 40 (1967) 160-167
- (88) MacGlashan, D., Jr.  
Histamine: A mediator of inflammation.  
J.Allergy Clin.Immunol. 112 (2003) S53-S59
- (89) MacGlashan, D., Jr. and Botana, L. M.  
Biphasic Ca<sup>2+</sup> responses in human basophils. Evidence that the initial transient elevation associated with the mobilization of intracellular calcium is an insufficient signal for degranulation.  
J.Immunol. 150 (1993) 980-991
- (90) MacGlashan, D., Jr., McKenzie-White, J., Chichester, K., Bochner, B. S., Davis, F. M., Schroeder, J. T., and Lichtenstein, L. M.

- In vitro regulation of FcεRIα expression on human basophils by IgE antibody.  
Blood. 91 (1998) 1633-1643
- (91) Maecker, H.  
Selecting Reagents for Multicolor Flow Cytometry Application Note 2012  
[http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor\\_AppNote.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_AppNote.pdf)  
Stand: 17-4-2013
- (92) Maecker, H. T., Frey, T., Nomura, L. E., and Trotter, J.  
Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity.  
Cytometry A. 62 (2004) 169-173
- (93) Maecker, H. T., Todd, S. C., and Levy, S.  
The tetraspanin superfamily: molecular facilitators.  
FASEB J. 11 (1997) 428-442
- (94) Maly, F. E., Marti-Wyss, S., Blumer, S., Cuhat-Stark, I., and Wüthrich, B.  
Mononuclear blood cell sulfidoleukotriene generation in the presence of interleukin-3 and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy.  
J.Investig.Allergol.Clin.Immunol. 7 (1997) 217-224
- (95) Marais, G. I., Fletcher, J. M., and Potter, P. C.  
In vivo and vitro in diagnosis of latex allergy at Groote Schuur Hospital.  
S.Afr.Med.J. 87 (1997) 1004-1008
- (96) Melan, M. A.  
Overview of Cell Fixation and Permeabilization.  
In: Immunocytochemical methods and protocols. Javois, L. C. (Hrsg.) Humana Press, Totowa, New Jersey, 1194, S.61
- (97) Metzelaar, M. J., Wijngaard, P. L., Peters, P. J., Sixma, J. J., Nieuwenhuis, H. K., and Clevers, H. C.  
CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells.  
J.Biol.Chem. 266 (1991) 3239-3245
- (98) Michova, A., Abugalia, M., Ivanova, Ts, Nikolov, G., Taskov, H., and Petrunov, B.  
Comparision of two-flow cytometry methods for basophil degranulation in patients sensitized to grass pollen.  
Allergy. 61 (2006) 1078-1083
- (99) Monneret, G.  
CCR3 for basophil activation test: a necessary but insufficient step.  
Clin.Exp.Allergy. 40 (2010) 953

- (100) Monneret, G.  
Is this time for CRTH2/DP2 in a flow cytometric basophil activation test?  
Clin.Exp.Allergy. 38 (2008) 1239-1240
- (101) Monneret, G., Benoit, Y., Debard, A. L., Gutowski, M. C., Topenot, I., and Bienvenu, J.  
Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs.  
Clin.Immunol. 102 (2002) 192-199
- (102) Mujumdar, S. R., Mujumdar, R. B., Grant, C. M., and Waggoner, A. S.  
Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters.  
Bioconjug.Chem. 7 (1996) 356-362
- (103) Murphy, K. P., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C.  
"Janeway's immunobiology"  
Garland Science, New York-Abingdon, 2012 8th. Auflage, S.573-574
- (104) Nagata, K. and Hirai, H.  
The second PGD(2) receptor CRTH2: structure, properties, and functions in leukocytes.  
Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids. 69 (2003) 169-177
- (105) Nakagawa, S., Okaya, Y., Yatsunami, K., Tanaka, S., Ohtsu, H., Fukui, T., Watanabe, T., and Ichikawa, A.  
Identification of multiple regulatory elements of human L-histidine decarboxylase gene.  
J.Biochem. 121 (1997) 935-940
- (106) Nishibori, M., Cham, B., McNicol, A., Shalev, A., Jain, N., and Gerrard, J. M.  
The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin.  
J.Clin.Invest. 91 (1993) 1775-1782
- (107) Norgaard, A., Skov, P. S., and Bindslev-Jensen, C.  
Egg and milk allergy in adults: comparison between fresh foods and commercial allergen extracts in skin prick test and histamine release from basophils.  
Clin.Exp.Allergy. 22 (1992) 940-947
- (108) Nullens, S., Sabato, V., Faber, M., Leysen, J., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., Falcone, F. H., Maurer, M., and Ebo, D. G.  
Basophilic histamine content and release during venom immunotherapy: Insights by flow cytometry.  
Cytometry B Clin.Cytom. 84 (2013) 173-178
- (109) Ocmant, A., Peignois, Y., Mulier, S., Hanssens, L., Michils, A., and Schandene, L.

- Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy.  
J.Immunol.Methods. 320 (2007) 40-48
- (110) Ohnmacht, C., Schwartz, C., Panzer, M., Schiedewitz, I., Naumann, R., and Voehringer, D.  
Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths.  
Immunity. 33 (2010) 364-374
- (111) Omerod, M. G.  
Fluorescence and fluorochromes.  
In: Flow Cytometry: A Practical Approach.Omerod, M. G. (Hrsg.) OUP Oxford, Oxford New York, 2000, 3rd Auflage. S.23-24
- (112) Omerod, M. G.  
Fluorescence and fluorochromes.  
In: Flow Cytometry: A Practical Approach.Ormerod, M. G. (Hrsg.) OUP Oxford, Oxford New York, 2000, 3rd Auflage. S.26
- (113) Ostergaard, P. A., Ebbesen, F., Nolte, H., and Skov, P. S.  
Basophil histamine release in the diagnosis of house dust mite and dander allergy of asthmatic children. Comparison between prick test, RAST, basophil histamine release and bronchial provocation.  
Allergy. 45 (1990) 231-235
- (114) Paris-Kohler, A., Demoly, P., Persi, L., Lebel, B., Bousquet, J., and Arnoux, B.  
In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest).  
J.Allergy Clin.Immunol. 105 (2000) 339-345
- (115) Pezzutto, A., Ulrichs, T., and Burmester, G. R.  
"Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik"  
Thieme Georg Verlag, Stuttgart New York, 2006 , S.78
- (116) Platz, I. J., Binder, M., Marxer, A., Lischka, G., Valent, P., and Buhring, H. J.  
Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 126 (2001) 335-342
- (117) Rahman, M.  
Introduction to Flow Cytometry  
<http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>  
Stand: 1-2-2013
- (118) Riley, J. F.

- Histamine in tissue mast cells.  
Science. 118 (1953) 332
- (119) Ring, J.  
"Allergy In Practice"  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2005 , S.5
- (120) Röcken, M. Biedermann T.  
Immunologische Grundlagen.  
In: Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Plewig, G. Landthaler M. Burgdorf W. H. C. Hertl M. Ruzicka T. (Hrsg.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012, 6. Auflage Auflage. S.21
- (121) Roederer, M., Kantor, A. B., Parks, D. R., and Herzenberg, L. A.  
Cy7PE and Cy7APC: bright new probes for immunofluorescence.  
Cytometry. 24 (1996) 191-197
- (122) Rotz, B., Savaser, A., Werthmann, I., Lau, S., and Wahn, U.  
Histamine measurement in whole blood and cell supernatants. A comparative study of two different radioimmunoassays.  
Allergy. 46 (1991) 529-533
- (123) Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Antepara, I., Uasuf, C., Vila, L., Garcia-Aviles, C., Chazot, M., and de Weck, A. L.  
Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics.  
Clin.Exp.Allergy. 32 (2002) 277-286
- (124) Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Garcia-Aviles, C., Vila, L., Dieguez, I., Antepara, I., and de Weck, A. L.  
Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 130 (2003) 33-39
- (125) Sanz, M. L., Gamboa, P. M., Garcia-Aviles, C., Vila, L., Dieguez, I., Antepara, I., and de Weck, A. L.  
Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 130 (2003) 33-39
- (126) Sanz, M. L., Maselli, J. P., Gamboa, P. M., Oehling, A., Dieguez, I., and de Weck, A. L.  
Flow cytometric basophil activation test: a review.  
J.Investig.Allergol.Clin.Immunol. 12 (2002) 143-154
- (127) Sanz, M. L., Sanchez, G., Gamboa, P. M., Vila, L., Uasuf, C., Chazot, M., Dieguez, I., and de Weck, A. L.

- Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*.  
Clin.Exp.Allergy. 31 (2001) 1007-1013
- (128) Scherer, K., Weber, J. M., Jermann, T. M., Krautheim, A., Tas, E., Ueberschlag, E. V., Cammarata, M., and Bircher, A. J.  
Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy.  
Int.Arch.Allergy Immunol. 146 (2008) 122-132
- (129) Schmidt, R. F., Lang, F., and Heckmann, M.  
"Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie"  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2007 29. Auflage, S.490
- (130) Schneider, E., Thieblemont, N., De Moraes, M. L., and Dy, M.  
Basophils: new players in the cytokine network.  
Eur.Cytokine Netw. 21 (2010) 142-153
- (131) Schwartz, C. and Voehringer, D.  
Basophils: important emerging players in allergic and anti-parasite responses.  
Bioessays. 33 (2011) 423-426
- (132) Sigma Aldrich  
Triton X-100  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/T8787?lang=de&region=DE>  
Stand: 14-4-2013
- (133) Southwick, P. L., Ernst, L. A., Tauriello, E. W., Parker, S. R., Mujumdar, R. B., Mujumdar, S. R., Clever, H. A., and Waggoner, A. S.  
Cyanine dye labeling reagents--carboxymethylindocyanine succinimidyl esters.  
Cytometry. 11 (1990) 418-430
- (134) Sturm, G. J., Bohm, E., Trummer, M., Weiglhofer, I., Heinemann, A., and Aberer, W.  
The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study.  
Allergy. 59 (2004) 1110-1117
- (135) Sturm, G. J., Kranzelbinder, B., Sturm, E. M., Heinemann, A., Groselj-Strele, A., and Aberer, W.  
The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors.  
Allergy. 64 (2009) 1319-1326
- (136) Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., and Karasuyama, H.

- Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis.  
Immunity. 28 (2008) 581-589
- (137) Ugucioni, M., Mackay, C. R., Ochensberger, B., Loetscher, P., Rhee, S., LaRosa, G. J., Rao, P., Ponath, P. D., Baggiolini, M., and Dahinden, C. A.  
High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines.  
J.Clin.Invest. 100 (1997) 1137-1143
- (138) Varga, R  
Vergleich des Basophilenaktivierungstest durch Bestimmung der Aktivitätsmarker CD63 und CD203c bei Patienten mit Insektengiftallergie  
<http://d-nb.info/997733985/34>  
Stand: 17-4-2013
- (139) Voehringer, D.  
Basophils in allergic immune responses.  
Curr.Opin.Immunol. 23 (2011) 789-793
- (140) Wedi, B., Novacovic, V., Koerner, M., and Kapp, A.  
Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression--inhibitory effects of anti-inflammatory drugs.  
J.Allergy Clin.Immunol. 105 (2000) 552-560
- (141) Wright, M. D. and Tomlinson, M. G.  
The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily.  
Immunol.Today. 15 (1994) 588-594
- (142) Würzburg, B. A. and Jardetzky, T. S.  
Structural insights into the interactions between human IgE and its high affinity receptor FcepsilonRI.  
Mol.Immunol. 38 (2002) 1063-1072
- (143) Xie, H. and He, S. H.  
Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases.  
World J.Gastroenterol. 11 (2005) 2851-2857
- (144) Yano, Y., Hayashi, Y., Sano, K., Shinmaru, H., Kuroda, Y., Yokozaki, H., Yoon, S., and Kasuga, M.  
Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma.  
Int.J.Mol.Med. 12 (2003) 763-766

## 7 Anhang

<b>Deskriptive Statistik: Identifizierung und Kontamination zelluläre Marker + Flow CAST® (Gruppen zusammengefasst)</b>					
	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Identifizierung (in % x 10<sup>-3</sup>)</b>					
CCR3+ neg	3,00	106,10	46,8	40,9692	28,17355
CCR3+ pos1	8,00	123,90	41,5	45,3231	34,51524
CCR3+ pos2	10,70	92,60	56,5	54,7615	25,21192
CCR3+ Allergen	5,80	111,10	52	53,0923	28,19877
IgE+ neg	1,60	93,10	41,3	37,8769	27,00883
IgE+ pos1	4,00	93,20	43,3	38,3231	29,10962
IgE+ pos2	6,80	92,50	43,7	46,0385	22,69528
IgE+ Allergen	2,90	103,50	46	47,4385	28,48931
CRTH2+/CD3- neg	2,24	103,48	25,28	33,3054	28,66336
CRTH2+/CD3- pos1	3,94	97,10	16,93	30,9815	29,44589
CRTH2+/CD3- pos2	6,49	107,35	39,25	41,3254	30,00210
CRTH2+/CD3- Allergen	3,25	116,61	25,28	38,0562	37,52471
203c+ neg.	1,00	81,00	40	34,5385	23,84888
203c+ pos1	3,00	76,00	24	30,3846	23,71897
203c+ pos2	6,00	74,00	42	41,0769	19,21571
203c+ Allergen	2,00	86,00	47	43,3846	24,45247
CCR3+/CD3- neg	2,72	100,12	36,7	37,2808	26,52832
CCR3+/CD3- pos1	8,05	107,07	25,45	36,3992	29,11933
CCR3+/CD3- pos2	8,48	87,48	51,48	49,1962	22,95342
CCR3+/CD3- Allergen	4,67	103,42	47,25	47,4938	26,01773
CCR3+/IgE+ neg	1,00	119,00	42	41,7154	34,01989
CCR3+/IgE+ pos1	2,80	85,00	31	36,5231	25,54519
CCR3+/IgE+ pos2	8,00	95,00	52	48,5462	24,43517
CCR3+/IgE+ Allergen	3,00	93,00	47	46,1385	26,22688
CCR3+/CD203c+ neg	1,00	82,00	39	34,0000	24,06934
CCR3+/CD203c+ pos1	3,00	80,00	20	31,3077	25,09112
CCR3+/CD203c+ pos2	8,00	79,00	45	41,8462	19,35995
CCR3+/CD203c+ Allergen	2,00	88,00	44	44,5385	26,66651
CRTH2+/CD3-/CD203c+ neg	,23	73,40	16,12	22,3492	22,84729
CRTH2+/CD3-/CD203c+ pos1	,05	68,06	9,39	19,1154	21,58428
CRTH2+/CD3-/CD203c+ pos2	,12	66,90	26,81	28,1223	22,25102
CRTH2+/CD3-/CD203c+ Allergen	,12	78,03	13,86	23,8023	25,60346
IgE+/CD203c+ neg	2,00	104,00	46	43,4615	32,46181
IgE+/CD203c+ pos1	3,00	93,00	28	36,2308	28,08960
IgE+/CD203c+ pos2	10,00	93,00	48	49,4615	23,96392
IgE+/CD203c+ Allergen	3,00	111,00	49	50,6154	31,77142
<b>Kontamination (in %)</b>					

## Anhang

CCR3+/CD3+ neg	3,62	21,95	7,58	9,3577	5,22943
CCR3+/CD3+ pos1	4,55	49,30	14,27	19,2469	11,55932
CCR3+/CD3+ pos2	4,10	20,45	9,77	10,7646	4,54763
CCR3+/CD3+ Allergen	1,28	26,38	9,03	11,1169	7,37696
IgE+/CCR3- neg	2,05	64,16	8,91	15,9638	16,91154
IgE+/CCR3-pos1	2,63	59,41	9,89	15,8915	15,37538
IgE+/CCR3- pos2	,67	63,44	8,71	13,4454	16,17997
IgE+/CCR3- Allergen	1,83	62,04	7,04	13,8315	16,07093
CRTH2+/CD3+ neg	11,74	49,83	30,17	31,6862	13,49203
CRTH2+/CD3+ pos1	10,20	75,90	38,84	38,2485	18,14139
CRTH2+/CD3+ pos2	16,76	55,35	32,3	34,7100	13,07257
CRTH2+/CD3+ Allergen	7,09	69,86	41,37	38,7508	21,01320
CCR3+/CD203c- neg	13,44	78,00	30,71	36,1308	17,77547
CCR3+/CD203c- pos1	26,80	74,83	50,73	51,3792	16,79375
CCR3+/CD203c- pos2	26,02	68,75	35,19	39,7615	13,30061
CCR3+/CD203c- Allergen	14,20	87,54	35,98	40,3531	20,84380
IgE+/CD203c- neg	3,81	67,51	9,94	18,6469	17,79629
IgE+/CD203c- pos1	5,33	67,68	18,73	25,8231	20,38343
IgE+/CD203c- pos2	1,74	66,53	10,62	16,8700	16,60520
IgE+/CD203c- Allergen	4,57	65,31	10,43	16,8500	16,29554
CRTH2+/CD203c- neg	35,60	95,61	59,62	61,5877	18,86447
CRTH2+/CD203c- pos1	43,79	98,67	62,07	65,5708	18,61230
CRTH2+/CD203c- pos2	36,23	95,71	55,4	60,5300	20,07170
CRTH2+/CD203c- Allergen	40,90	98,09	61,8	66,3623	18,85257
CRTH2+/CD3-/CD203c- neg	12,29	93,65	49,55	44,5808	24,88767
CRTH2+/CD3-/CD203c- pos1	20,68	98,57	43,53	49,5662	24,99541
CRTH2+/CD3-/CD203c- pos2	9,52	98,16	32,48	40,5631	28,19279
CRTH2+/CD3-/CD203c- Allergen	21,54	97,26	43,03	47,5154	24,35425
<b>Flow CAST®</b>					
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> neg	9,00	878,00		106,9231	233,99162
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos1	10,00	1276,00		132,6154	345,03926
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos2	7,00	1183,00		118,3077	321,11716
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> Allergen	12,00	817,00		100,1538	217,94756

Deskriptive Statistik Aktivierung zelluläre Marker + Flow CAST®/HistaFlow/Deltawerte					
Patienten					
Marker	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
<b>Aktivierung zelluläre Marker (in %)</b>					
CCR3+ neg	12,87	9,56	1,98	41,10	11,24
CCR3+ pos1	31,99	30,42	17,92	56,45	11,00
CCR3+ pos2	22,34	20,39	5,56	41,49	11,91
CCR3+ Allergen	43,21	43,57	10,54	63,86	16,36
CCR3+/CD3- neg	12,68	9,19	1,56	47,33	13,35
CCR3+/CD3- pos1	35,30	35,56	18,75	56,15	10,43
CCR3+/CD3- pos2	23,35	21,14	5,81	45,65	12,76
CCR3+/CD3- Allergen	44,04	45,99	10,33	66,21	15,74
IgE+/CCR3+ neg	19,83	8,60	1,50	90,37	28,17
IgE+/CCR3+ pos1	49,93	50,08	31,82	77,65	15,60
IgE+/CCR3+ pos2	30,44	27,33	1,83	81,51	22,47
IgE+/CCR3+ Allergen	63,31	65,03	34,47	88,90	15,48
CRTH2+/CD3- neg	8,70	3,16	,65	40,91	12,66
CRTH2+/CD3- pos1	26,26	25,18	0,00	49,41	18,18
CRTH2+/CD3- pos2	14,67	14,76	,75	55,73	16,28
CRTH2+/CD3- Allergen	33,24	34,78	0,00	61,59	19,18
203c+/CCR3+ neg	20,20	10,88	1,69	80,26	26,45
203c+/CCR3+ pos1	53,59	56,42	31,91	70,26	14,31
203c+/CCR3+ pos2	28,22	26,49	1,64	56,41	17,28
203c+/CCR3+ Allergen	61,02	61,60	37,60	79,01	15,07
203c+/CRTH2+ neg	24,56	14,97	5,41	93,13	28,57
203c+/CRTH2+ pos1	56,36	56,97	31,83	79,76	15,35
203c+/CRTH2+ pos2	33,46	30,79	2,72	76,65	22,45
203c+/CRTH2+ Allergen	61,66	64,95	18,97	86,84	22,02
203c+/IgE+neg	35,76	23,67	17,12	90,58	24,66
203c+/IgE+pos1	62,61	60,64	38,66	82,72	14,69
203c+/IgE+pos2	40,86	38,35	13,01	83,03	20,29
203c+/IgE+Allergen	69,66	70,81	48,88	89,87	13,53
203c+ neg	20,38	10,26	1,81	85,37	27,14
203c+ pos1	55,69	56,76	30,31	84,13	16,68
203c+ pos2	31,88	27,89	3,34	87,23	24,12
203c+ Allergen	65,54	66,60	36,40	94,64	16,78
<b>Flow CAST®</b>					
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) $\times 10^{-3}$ neg	132,90	53,00	9,00	878,00	264,07
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) $\times 10^{-3}$ pos1	166,20	32,50	10,00	1276,00	391,53
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) $\times 10^{-3}$ pos2	148,70	31,00	7,00	1183,00	364,74
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) $\times 10^{-3}$ Allergen	123,40	36,00	12,00	817,00	246,43
CD63 pos (% der Basophilen) neg	3,35	2,09	,94	7,64	2,56
CD63 pos (% der Basophilen) pos1	75,84	77,72	58,37	90,34	11,16

## Anhang

CD63 pos (% der Basophilen) pos2	20,42	18,19	3,50	40,02	12,74
CD63 pos (% der Basophilen) Allergen	88,64	92,30	75,26	99,54	8,34
<b>HistaFlow</b>					
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> PBS	88,73	37,14	4,00	406,00	126,01
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> neg	116,29	48,00	2,00	537,00	164,79
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos1	43,15	20,50	,60	228,00	70,20
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos2	136,19	86,00	2,00	429,00	142,62
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> Allergen	52,83	33,50	,80	203,00	61,09
absolute Zahl Basophile PBS	1125	492	95	5307	1607
absolute Zahl Basophile neg	1188	582	56	5324	1564
absolute Zahl Basophile pos1	290	148	19	762	286
absolute Zahl Basophile pos2	856	440	42	3943	1131
absolute Zahl Basophile Allergen	474	306	20	2036	605
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) PBS	4,05	2,05	0,00	17,74	5,45
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) neg	1,79	,79	,15	8,93	2,68
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) pos1	34,18	23,18	2,80	100,00	31,83
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) pos2	6,85	5,24	0,00	26,47	7,55
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) Allergen	38,05	28,24	,28	92,16	32,71
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) PBS	26	11	0	106	33
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) neg	10	6	1	48	14
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) pos1	73	26	11	398	119
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) pos2	58	27	0	291	88
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) Allergen	99	46	2	374	128
DAO+/CD63- (% der Basophilen) PBS	3,59	2,39	1,23	12,63	3,39
DAO+/CD63- (% der Basophilen) neg	25,26	15,45	1,70	90,98	27,20
DAO+/CD63- (% der Basophilen) pos1	25,50	16,66	0,00	91,63	30,50
DAO+/CD63- (% der Basophilen) pos2	30,04	20,33	3,84	66,52	24,06
DAO+/CD63- (% der Basophilen) Allergen	29,95	11,78	0,00	94,78	32,85
DAO+/CD63- (absolute Zahl) PBS	30	11	2	100	37
DAO+/CD63- (absolute Zahl) neg	288	116	1	836	328
DAO+/CD63- (absolute Zahl) pos1	105	22	0	458	173
DAO+/CD63- (absolute Zahl) pos2	158	130	22	470	146
DAO+/CD63- (absolute Zahl) Allergen	108	32	0	672	204
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) PBS	,45	,18	0,00	2,11	,66
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) neg	,33	,20	0,00	1,09	,41
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) pos1	3,99	1,55	0,00	23,17	7,12
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) pos2	3,00	1,00	0,00	17,11	5,34
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) Allergen	6,23	3,91	0,00	25,00	8,04
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) PBS	2	2	0	4	1
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) neg	3	2	0	12	4
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) pos1	7	4	0	19	8
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) pos2	16	7	0	64	21
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) Allergen	8	9	0	27	8
DAO-/CD63- (% der Basophilen) PBS	93,32	94,83	78,95	98,04	5,56
DAO-/CD63- (% der Basophilen) neg	73,41	82,57	8,44	98,15	26,86

## Anhang

DAO-/CD63- (% der Basophilen) pos1	39,55	33,45	0,00	87,40	30,32
DAO-/CD63- (% der Basophilen) pos2	62,71	73,41	24,33	95,82	26,46
DAO-/CD63- (% der Basophilen) Allergen	31,95	22,33	5,10	95,47	31,48
DAO-/CD63- (absolute Zahl) PBS	1071	472	75	5119	1547
DAO-/CD63- (absolute Zahl) neg	890	402	54	4443	1344
DAO-/CD63- (absolute Zahl) pos1	110	65	0	527	156
DAO-/CD63- (absolute Zahl) pos2	638	239	15	3189	954
DAO-/CD63- (absolute Zahl) Allergen	264	55	2	1685	530
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) PBS	2,73	1,89	0,00	6,32	2,33
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) neg	1,01	,86	0,00	3,50	1,04
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) pos1	30,97	21,39	2,09	100,00	31,26
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) pos2	4,25	4,87	0,00	8,60	2,92
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) Allergen	31,89	16,76	0,00	88,24	32,30
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) PBS	23	9	0	98	31
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) neg	7	5	0	33	10
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) pos1	68	20	9	382	115
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) pos2	44	18	0	251	75
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) Allergen	93	42	0	342	122
<b>Deltawerte (in %)</b>					
Delta Flow CAST® pos1	72,49	71,82	55,97	89,40	12,17
Delta Flow CAST® pos2	17,07	15,87	2,56	33,73	11,81
Delta Flow CAST® Allergen	85,29	86,05	72,85	93,47	8,09
Delta CCR3+ pos1	19,11	21,95	-13,18	49,47	18,00
Delta CCR3+ pos2	9,47	6,37	-6,96	27,79	11,78
Delta CCR3+ Allergen	30,34	34,28	-30,56	56,88	25,63
Delta CCR3+/CD3- pos1	22,63	27,01	-18,33	53,28	20,37
Delta CCR3+/CD3- pos2	10,67	7,24	-9,38	32,12	12,85
Delta CCR3+/CD3- Allergen	31,36	36,10	-37,00	54,63	27,06
Delta IgE+/CCR3+ pos1	30,10	32,56	-12,72	59,42	21,79
Delta IgE+/CCR3+ pos2	10,61	14,88	-8,86	25,40	12,32
Delta IgE+/CCR3+ Allergen	43,48	46,87	-1,47	73,54	22,23
Delta CRTH2+/CD3- pos1	17,56	12,32	-3,33	46,52	17,69
Delta CRTH2+/CD3- pos2	5,97	4,77	-2,93	15,45	7,28
Delta CRTH2+/CD3- Allergen	24,54	29,84	-4,76	59,21	20,33
Delta CCR3+/CD203c+ pos1	33,38	39,52	-22,36	62,29	26,70
Delta CCR3+/CD203c+ pos2	8,01	14,73	-23,85	21,86	15,69
Delta CCR3+/CD203c+ Allergen	40,82	38,78	-1,25	75,40	22,72
Delta CRTH2+/CD203c+ pos1	31,79	40,91	-13,37	58,47	23,06
Delta CRTH2+/CD203c+ pos2	8,90	10,96	-16,48	23,53	13,30
Delta CRTH2+/CD203c+ Allergen	37,10	33,78	-6,71	71,35	24,84
Delta IgE+/CD203c+ neg	26,85	26,42	-7,86	51,81	18,90
Delta IgE+/CD203c+ neg	5,10	9,57	-16,19	20,36	13,63
Delta IgE+/CD203c+ neg	33,90	31,86	-,71	60,53	19,52
Delta CD203c+ pos1	35,30	39,57	-1,24	60,52	20,89
Delta CD203c+ pos2g	11,50	14,13	-3,63	24,45	10,84

## Anhang

Delta CD203c+ Allergen	45,16	50,40	9,27	73,70	20,59
------------------------	-------	-------	------	-------	-------

Deskriptive Statistik Aktivierung zelluläre Marker + Flow CAST®/HistaFlow/Deltawerte					
Kontrollen					
Marker	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
<b>Aktivierung zelluläre Marker (in %)</b>					
CCR3+ neg	10,94	12,08	7,30	13,44	3,22
CCR3+ pos1	31,01	29,19	7,39	56,45	24,58
CCR3+ pos2	13,39	11,38	5,71	23,08	8,86
CCR3+ Allergen	4,79	5,02	1,24	8,11	3,44
CCR3+/CD3- neg	7,34	6,11	4,85	11,05	3,28
CCR3+/CD3- pos1	31,12	21,65	7,57	64,15	29,46
CCR3+/CD3- pos2	12,33	11,93	4,58	20,47	7,95
CCR3+/CD3- Allergen	4,25	3,48	1,08	8,19	3,62
IgE+/CCR3+ neg	5,12	5,79	2,63	6,95	2,24
IgE+/CCR3+ pos1	31,21	16,62	7,42	69,58	33,55
IgE+/CCR3+ pos2	8,00	7,38	6,65	9,96	1,74
IgE+/CCR3+ Allergen	4,56	4,50	1,04	8,13	3,55
CRTH2+/CD3- neg	4,49	4,50	3,35	5,61	1,13
CRTH2+/CD3- pos1	29,67	33,33	6,24	49,44	21,83
CRTH2+/CD3- pos2	8,52	5,79	5,53	14,23	4,95
CRTH2+/CD3- Allergen	1,31	1,34	,71	1,88	,59
203c+/CCR3+ neg	8,27	7,31	7,12	10,39	1,84
203c+/CCR3+ pos1	56,87	74,87	10,02	85,71	40,93
203c+/CCR3+ pos2	29,52	34,51	9,05	45,00	18,49
203c+/CCR3+ Allergen	5,63	4,61	3,62	8,67	2,68
203c+/CRTH2+ neg	21,01	8,63	8,38	46,03	21,67
203c+/CRTH2+ pos1	59,06	76,43	12,20	88,54	41,03
203c+/CRTH2+ pos2	19,64	12,61	9,86	36,44	14,62
203c+/CRTH2+ Allergen	7,15	8,07	4,49	8,89	2,34
203c+/IgE+neg	30,52	13,95	7,08	70,52	34,81
203c+/IgE+pos1	58,64	76,68	19,70	79,53	33,75
203c+/IgE+pos2	25,20	16,32	10,99	48,29	20,17
203c+/IgE+Allergen	16,17	10,53	9,97	28,02	10,26
203c+ neg	8,85	6,52	4,50	15,52	5,87
203c+ pos1	55,24	73,03	11,07	81,61	38,49
203c+ pos2	14,79	7,67	6,54	30,16	13,32
203c+ Allergen	4,90	4,56	2,29	7,84	2,79
<b>Flow CAST®</b>					
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> neg	20,33	17,00	13,00	31,00	9,45
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos1	20,67	19,00	16,00	27,00	5,69
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos2	17,00	17,00	14,00	20,00	3,00
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> Allergen	22,67	23,00	18,00	27,00	4,51

## Anhang

CD63 pos (% der Basophilen) neg	3,51	4,26	1,77	4,50	1,51
CD63 pos (% der Basophilen) pos1	79,13	89,78	51,18	96,44	24,44
CD63 pos (% der Basophilen) pos2	25,53	15,49	2,58	58,52	29,29
CD63 pos (% der Basophilen) Allergen	5,66	5,90	1,31	9,76	4,23
<b>HistaFlow</b>					
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> PBS	85,00	79,00	50,00	126,00	38,35
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> neg	108,33	103,00	7,00	215,00	104,10
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos1	163,67	40,00	22,00	429,00	229,96
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> pos2	235,95	237,00	6,86	464,00	228,57
rel. Zahl Basophile (% aller Zellen) × 10 <sup>-3</sup> Allergen	264,67	259,00	129,00	406,00	138,59
absolute Zahl Basophile PBS	1374	940	781	2400	892
absolute Zahl Basophile neg	892	699	173	1804	832
absolute Zahl Basophile pos1	372	183	68	864	430
absolute Zahl Basophile pos2	640	480	151	1288	585
absolute Zahl Basophile Allergen	449	300	112	934	431
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) PBS	3,58	4,08	1,28	5,38	2,10
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) neg	1,74	1,33	,43	3,47	1,56
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) pos1	18,30	8,74	4,98	41,18	19,90
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) pos2	3,81	1,04	,47	9,93	5,30
CD203c+/CD63+ (% der Basophilen) Allergen	3,77	2,25	,40	8,67	4,34
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) PBS	51	42	12	98	44
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) neg	11	6	3	24	11
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) pos1	29	28	16	43	14
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) pos2	9	6	5	15	6
CD203c+/CD63+ (absolute Zahl) Allergen	16	21	2	26	13
DAO+/CD63- (% der Basophilen) PBS	1,78	1,92	1,38	2,05	,36
DAO+/CD63- (% der Basophilen) neg	26,08	28,76	6,36	43,13	18,53
DAO+/CD63- (% der Basophilen) pos1	36,43	37,50	22,06	49,73	13,87
DAO+/CD63- (% der Basophilen) pos2	14,93	17,24	4,64	22,92	9,36
DAO+/CD63- (% der Basophilen) Allergen	24,22	24,33	22,54	25,80	1,63
DAO+/CD63- (absolute Zahl) PBS	25	16	13	46	18
DAO+/CD63- (absolute Zahl) neg	330	201	11	778	399
DAO+/CD63- (absolute Zahl) pos1	143	91	15	324	161
DAO+/CD63- (absolute Zahl) pos2	113	110	7	222	108
DAO+/CD63- (absolute Zahl) Allergen	142	112	73	241	88
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) PBS	,21	,13	0,00	,51	,27
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) neg	,17	0,00	0,00	,50	,29
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) pos1	2,45	1,85	1,09	4,41	1,74
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) pos2	,19	,16	0,00	,42	,21
DAO+/CD63+ (% der Basophilen) Allergen	1,10	,96	0,00	2,33	1,17
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) PBS	2	3	0	4	2
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) neg	3	0	0	9	5
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) pos1	7	3	2	16	8
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) pos2	1	2	0	2	1
DAO+/CD63+ (absolute Zahl) Allergen	5	7	0	9	5

## Anhang

DAO-/CD63- (% der Basophilen)PBS	94,42	94,00	91,93	97,34	2,73
DAO-/CD63- (% der Basophilen) neg	71,99	70,82	55,54	89,60	17,06
DAO-/CD63- (% der Basophilen) pos1	44,78	41,53	35,29	57,52	11,47
DAO-/CD63- (% der Basophilen) pos2	81,23	82,22	76,04	85,43	4,77
DAO-/CD63- (% der Basophilen) Allergen	71,89	71,95	66,67	77,06	5,20
DAO-/CD63- (absolute Zahl) PBS	1296	915	718	2256	837
DAO-/CD63- (absolute Zahl) neg	551	495	155	1002	426
DAO-/CD63- (absolute Zahl) pos1	199	76	24	497	259
DAO-/CD63- (absolute Zahl) pos2	518	365	129	1059	483
DAO-/CD63- (absolute Zahl) Allergen	418	383	200	672	238
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) PBS	3,58	3,96	1,28	5,51	2,14
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) neg	1,77	,83	,43	4,05	1,98
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) pos1	16,34	7,65	3,13	38,24	19,10
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) pos2	3,65	,63	,39	9,93	5,44
DAO-/CD63+ (% der Basophilen) Allergen	2,79	1,29	,40	6,67	3,39
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) PBS	50	43	12	95	42
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) neg	8	7	3	15	6
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) pos1	22	26	14	27	7
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) pos2	8	5	3	15	6
DAO-/CD63+ (absolute Zahl) Allergen	11	12	2	20	9
<b>Deltawerte (in%)</b>					
Delta Flow CAST® pos1	75,62	85,28	46,92	94,67	25,30
Delta Flow CAST® pos2	22,02	11,23	,81	54,02	28,20
Delta Flow CAST® Allergen	2,15	1,64	-,46	5,26	2,89
Delta CCR3+ pos1	20,07	17,11	,09	43,01	21,61
Delta CCR3+ pos2	2,45	-1,59	-2,06	11,00	7,41
Delta CCR3+ Allergen	-6,15	-5,33	-10,84	-2,28	4,34
Delta CCR3+/CD3- pos1	23,79	16,80	1,46	53,10	26,52
Delta CCR3+/CD3- pos2	4,99	,88	-1,53	15,62	9,28
Delta CCR3+/CD3- Allergen	-3,09	-2,86	-3,77	-2,63	,60
Delta IgE+/CCR3+ pos1	26,08	13,99	,47	63,79	33,35
Delta IgE+/CCR3+ pos2	2,87	1,59	-,30	7,33	3,97
Delta IgE+/CCR3+ Allergen	-,57	-1,59	-2,45	2,34	2,55
Delta CRTH2+/CD3- pos1	25,18	29,98	,63	44,94	22,54
Delta CRTH2+/CD3- pos2	4,03	1,29	-,08	10,88	5,97
Delta CRTH2+/CD3- Allergen	-3,18	-3,16	-3,73	-2,64	,55
Delta CCR3+/CD203c+ pos1	48,59	67,56	2,90	75,32	39,76
Delta CCR3+/CD203c+ pos2	21,25	24,12	1,74	37,88	18,24
Delta CCR3+/CD203c+ Allergen	-2,64	-2,51	-6,77	1,36	4,07
Delta CRTH2+/CD203c+ pos1	38,04	42,51	3,82	67,80	32,22
Delta CRTH2+/CD203c+ pos2	-1,38	1,48	-9,59	3,98	7,22
Delta CRTH2+/CD203c+ Allergen	-13,86	-3,89	-37,14	-,56	20,23
Delta IgE+/CD203c+ neg	28,12	9,01	5,75	69,60	35,96
Delta IgE+/CD203c+ neg	-5,32	2,37	-22,23	3,91	14,67
Delta IgE+/CD203c+ neg	-14,34	-3,98	-42,50	3,45	24,67

## Anhang

Delta CD203c+ pos1	46,39	66,09	4,55	68,53	36,26
Delta CD203c+ pos2g	5,94	3,17	,02	14,64	7,69
Delta CD203c+ Allergen	-3,95	-1,96	-13,23	3,34	8,46

Kontamination			
Test bei gepaarten Stichproben			
		Gepaarte Differenzen	Sig. (2-seitig)
		Mittelwert	
Paaren 1	CCR3+/CD3+ neg - CRTH2+/CD3+ neg	-22,32846	,000
Paaren 2	CCR3+/CD3+ pos1 - CRTH2+/CD3+ pos1	-19,00154	,000
Paaren 3	CCR3+/CD3+ pos2 - CRTH2+/CD3+ pos2	-23,94538	,000
Paaren 4	CCR3+/CD3+ Allergen - CRTH2+/CD3+ Allergen	-27,63385	,000
Paaren 5	CCR3+/CD203c- neg - IgE+/CD203c- neg	17,48385	,001
Paaren 6	CCR3+/CD203c- pos1 - IgE+/CD203c- pos1	25,55615	,001
Paaren 7	CCR3+/CD203c- pos2 - IgE+/CD203c- pos2	22,89154	,000
Paaren 8	CCR3+/CD203c- Allergen - IgE+/CD203c- Allergen	23,50308	,001
Paaren 9	CCR3+/CD203c- neg - CRTH2+/CD203c- neg	-25,45692	,001
Paaren 10	CCR3+/CD203c- pos1 - CRTH2+/CD203c- pos1	-14,19154	,065
Paaren 11	CCR3+/CD203c- pos2 - CRTH2+/CD203c- pos2	-20,76846	,004
Paaren 12	CCR3+/CD203c- Allergen - CRTH2+/CD203c- Allergen	-26,00923	,003
Paaren 13	CCR3+/CD203c- neg - CRTH2+/CD3-/CD203c- neg	-8,45000	,253
Paaren 14	CCR3+/CD203c- pos1 - CRTH2+/CD3-/CD203c- pos1	1,81308	,825
Paaren 15	CCR3+/CD203c- pos2 - CRTH2+/CD3-/CD203c- pos2	-,80154	,924
Paaren 16	CCR3+/CD203c- Allergen - CRTH2+/CD3-/CD203c- Allergen	-7,16231	,347
Paaren 17	IgE+/CD203c- neg - CRTH2+/CD203c- neg	-42,94077	,000
Paaren 18	IgE+/CD203c- pos1 - CRTH2+/CD203c- pos1	-39,74769	,000
Paaren 19	IgE+/CD203c- pos2 - CRTH2+/CD203c- pos2	-43,66000	,000
Paaren 20	IgE+/CD203c- Allergen - CRTH2+/CD203c- Allergen	-49,51231	,000
Paaren 21	IgE+/CD203c- neg - CRTH2+/CD3-/CD203c- neg	-25,93385	,006
Paaren 22	IgE+/CD203c- pos1 - CRTH2+/CD3-/CD203c- pos1	-23,74308	,025
Paaren 23	IgE+/CD203c- pos2 - CRTH2+/CD3-/CD203c- pos2	-23,69308	,019
Paaren 24	IgE+/CD203c- Allergen - CRTH2+/CD3-/CD203c- Allergen	-30,66538	,003
Paaren 25	CRTH2+/CD203c- neg - CRTH2+/CD3-/CD203c- neg	17,00692	,000
Paaren 26	CRTH2+/CD203c- pos1 - CRTH2+/CD3-/CD203c- pos1	16,00462	,001
Paaren 27	CRTH2+/CD203c- pos2 - CRTH2+/CD3-/CD203c- pos2	19,96692	,000
Paaren 28	CRTH2+/CD203c- Allergen - CRTH2+/CD3-/CD203c- Allergen	18,84692	,000
Paaren 1	CCR3+/CD3+ neg - IgE+/CD203c- neg	-9,28923	,091
Paaren 2	CCR3+/CD3+ pos1 - IgE+/CD203c- pos1	-6,57615	,365
Paaren 3	CCR3+/CD3+ pos2 - IgE+/CD203c- pos2	-6,10538	,235
Paaren 4	CCR3+/CD3+ Allergen - IgE+/CD203c- Allergen	-5,73308	,295

CCR3 von BD vs. Flow CAST®				
Test bei gepaarten Stichproben				
Gruppe (o-Kontrolle, 1-Patienten)			Gepaarte Differenzen	Sig. (2-seitig)
			Mittelwert	
0	Paaren 1	CCR3+ pos1 - CD63 pos (% der Basophilen) pos1	-48,12333	,017
	Paaren 2	CCR3+ pos2 - CD63 pos (% der Basophilen) pos2	-12,14000	,444
	Paaren 3	CCR3+ Allergen - CD63 pos (% der Basophilen) Allergen	-,86667	,863
1	Paaren 1	CCR3+ pos1 - CD63 pos (% der Basophilen) pos1	-43,85300	,000
	Paaren 2	CCR3+ pos2 - CD63 pos (% der Basophilen) pos2	1,92400	,565
	Paaren 3	CCR3+ Allergen - CD63 pos (% der Basophilen) Allergen	-45,43100	,000

Delta CCR3 von BD vs. Delta Flow CAST®				
Test bei gepaarten Stichproben				
Gruppe (o-Kontrolle, 1-Patienten)			Gepaarte Differenzen	Sig. (2-seitig)
			Mittelwert	
0	Paaren 1	Delta CCR3+ pos1 - Delta Flow CAST® pos1	-55,55333	,013
	Paaren 2	Delta CCR3+ pos2 - Delta Flow CAST® pos2	-19,57000	,246
	Paaren 3	Delta CCR3+ Allergen - Delta Flow CAST® Allergen	-8,29667	,168
1	Paaren 1	Delta CCR3+ pos1 - Delta Flow CAST® pos1	-53,37400	,000
	Paaren 2	Delta CCR3+ pos2 - Delta Flow CAST® pos2	-7,59700	,027
	Paaren 3	Delta CCR3+ Allergen - Delta Flow CAST® Allergen	-54,95200	,000

Delta CCR vs. Delta restliche zelluläre Marker				
Test bei gepaarten Stichproben				
Gruppe (o-Kontrolle, 1-Patienten)			Gepaarte Differenzen	Sig. (2-seitig)
			Mittelwert	
0	Paaren 1	Delta CCR3+ pos1 - Delta CCR3+/CD3- pos1	-3,71667	,368
	Paaren 2	Delta CCR3+ pos2 - Delta CCR3+/CD3- pos2	-2,54000	,197
	Paaren 3	Delta CCR3+ Allergen - Delta CCR3+/CD3- Allergen	-3,06333	,292
	Paaren 4	Delta CCR3+ pos1 - Delta IgE+/CCR3+ pos1	-6,01333	,504
	Paaren 5	Delta CCR3+ pos2 - Delta IgE+/CCR3+ pos2	-,42333	,863
	Paaren 6	Delta CCR3+ Allergen - Delta IgE+/CCR3+ Allergen	-5,58333	,195
	Paaren 7	Delta CCR3+ pos1 - Delta CRTH2+/CD3- pos1	-5,11333	,320
	Paaren 8	Delta CCR3+ pos2 - Delta CRTH2+/CD3- pos2	-1,58000	,256
	Paaren 9	Delta CCR3+ Allergen - Delta CRTH2+/CD3- Allergen	-2,97333	,402
	Paaren 10	Delta CCR3+ pos1 - Delta CCR3+/CD203c+ pos1	-28,52333	,219
	Paaren 11	Delta CCR3+ pos2 - Delta CCR3+/CD203c+ pos2	-18,79667	,221
	Paaren 12	Delta CCR3+ Allergen - Delta CCR3+/CD203c+	-3,51000	,224

	Allergen			
Paaren 13	Delta CCR3+ pos1 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos1	-17,97333	,128	
Paaren 14	Delta CCR3+ pos2 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos2	3,82667	,694	
Paaren 15	Delta CCR3+ Allergen - Delta CRTH2+/CD203c+ Allergen	7,71333	,501	
Paaren 16	Delta CCR3+ pos1 - Delta IgE+/CD203c+ neg	-8,05000	,508	
Paaren 17	Delta CCR3+ pos2 - Delta IgE+/CD203c+ neg	7,76667	,604	
Paaren 18	Delta CCR3+ Allergen - Delta IgE+/CD203c+ neg	8,19333	,569	
Paaren 19	Delta CCR3+ pos1 - Delta CD203c+ pos1	-26,32000	,177	
Paaren 20	Delta CCR3+ pos2 - Delta CD203c+ pos2g	-3,49333	,079	
Paaren 21	Delta CCR3+ Allergen - Delta CD203c+ Allergen	-2,20000	,577	
1	Paaren 1	Delta CCR3+ pos1 - Delta CCR3+/CD3- pos1	-3,51100	,042
	Paaren 2	Delta CCR3+ pos2 - Delta CCR3+/CD3- pos2	-1,19900	,078
	Paaren 3	Delta CCR3+ Allergen - Delta CCR3+/CD3- Allergen	-1,01500	,433
	Paaren 4	Delta CCR3+ pos1 - Delta IgE+/CCR3+ pos1	-10,98900	,001
	Paaren 5	Delta CCR3+ pos2 - Delta IgE+/CCR3+ pos2	-1,14300	,603
	Paaren 6	Delta CCR3+ Allergen - Delta IgE+/CCR3+ Allergen	-13,13700	,001
	Paaren 7	Delta CCR3+ pos1 - Delta CRTH2+/CD3- pos1	1,55400	,739
	Paaren 8	Delta CCR3+ pos2 - Delta CRTH2+/CD3- pos2	3,49700	,400
	Paaren 9	Delta CCR3+ Allergen - Delta CRTH2+/CD3- Allergen	5,80000	,354
	Paaren 10	Delta CCR3+ pos1 - Delta CCR3+/CD203c+ pos1	-14,26900	,006
	Paaren 11	Delta CCR3+ pos2 - Delta CCR3+/CD203c+ pos2	1,45700	,619
	Paaren 12	Delta CCR3+ Allergen - Delta CCR3+/CD203c+ Allergen	-10,47400	,012
	Paaren 13	Delta CCR3+ pos1 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos1	-12,68000	,001
	Paaren 14	Delta CCR3+ pos2 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos2	,56900	,828
	Paaren 15	Delta CCR3+ Allergen - Delta CRTH2+/CD203c+ Allergen	-6,75600	,139
	Paaren 16	Delta CCR3+ pos1 - Delta IgE+/CD203c+ neg	-7,73400	,009
	Paaren 17	Delta CCR3+ pos2 - Delta IgE+/CD203c+ neg	4,37300	,167
	Paaren 18	Delta CCR3+ Allergen - Delta IgE+/CD203c+ neg	-3,55900	,479
	Paaren 19	Delta CCR3+ pos1 - Delta CD203c+ pos1	-16,19000	,000
	Paaren 20	Delta CCR3+ pos2 - Delta CD203c+ pos2g	-2,03200	,404
	Paaren 21	Delta CCR3+ Allergen - Delta CD203c+ Allergen	-14,82100	,005

Delta Flow CAST® vs. Delta zelluläre Marker				
Test bei gepaarten Stichproben				
Gruppe (0-Kontrollen, 1-Patienten)			Gepaarte Differenzen	Sig. (2-seitig)
			Mittelwert	
0	Paaren 1	Delta pos1 - Delta CCR3+/CD3- pos1	51,83667	,025
	Paaren 2	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CCR3+/CD3- pos2	17,03000	,271
	Paaren 3	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CCR3+/CD3- Allergen	5,23333	,118
	Paaren 4	Delta Flow CAST® pos1 - Delta IgE+/CCR3+ pos1	49,54000	,052

	Paaren 5	Delta Flow CAST® pos2 - Delta IgE+/CCR3+ pos2	19,14667	,311	
	Paaren 6	Delta Flow CAST® Allergen - Delta IgE+/CCR3+ Allergen	2,71333	,444	
	Paaren 7	Delta Flow CAST® pos1 - Delta CRTH2+/CD3-pos1	50,44000	,003	
	Paaren 8	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CRTH2+/CD3-pos2	17,99000	,301	
	Paaren 9	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CRTH2+/CD3-Allergen	5,32333	,071	
	Paaren 10	Delta Flow CAST® pos1 - Delta CCR3+/CD203c+ pos1	27,03000	,111	
	Paaren 11	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CCR3+/CD203c+ pos2	,77333	,967	
	Paaren 12	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CCR3+/CD203c+ Allergen	4,78667	,355	
	Paaren 13	Delta Flow CAST® pos1 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos1	37,58000	,020	
	Paaren 14	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos2	23,39667	,371	
	Paaren 15	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CRTH2+/CD203c+ Allergen	16,01000	,351	
	Paaren 16	Delta Flow CAST® pos1 - Delta IgE+/CD203c+ neg	47,50333	,088	
	Paaren 17	Delta Flow CAST® pos2 - Delta IgE+/CD203c+ neg	27,33667	,384	
	Paaren 18	Delta Flow CAST® Allergen - Delta IgE+/CD203c+ neg	16,49000	,408	
	Paaren 19	Delta Flow CAST® pos1 - Delta CD203c+ pos1	29,23333	,051	
	Paaren 20	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CD203c+ pos2g	16,07667	,321	
	Paaren 21	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CD203c+ Allergen	6,09667	,450	
	1	Paaren 1	Delta Flow CAST® pos1 - Delta CCR3+/CD3- pos1	49,86300	,000
		Paaren 2	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CCR3+/CD3- pos2	6,39800	,074
		Paaren 3	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CCR3+/CD3-Allergen	53,93700	,000
		Paaren 4	Delta Flow CAST® pos1 - Delta IgE+/CCR3+ pos1	42,38500	,000
Paaren 5		Delta Flow CAST® pos2 - Delta IgE+/CCR3+ pos2	6,45400	,070	
Paaren 6		Delta Flow CAST® Allergen - Delta IgE+/CCR3+ Allergen	41,81500	,001	
Paaren 7		Delta Flow CAST® pos1 - Delta CRTH2+/CD3-pos1	54,92800	,000	
Paaren 8		Delta Flow CAST® pos2 - Delta CRTH2+/CD3-pos2	11,09400	,025	
Paaren 9		Delta Flow CAST® Allergen - Delta CRTH2+/CD3-Allergen	60,75200	,000	
Paaren 10		Delta Flow CAST® pos1 - Delta CCR3+/CD203c+ pos1	39,10500	,002	
Paaren 11		Delta Flow CAST® pos2 - Delta CCR3+/CD203c+ pos2	9,05400	,048	
Paaren 12		Delta Flow CAST® Allergen - Delta CCR3+/CD203c+ Allergen	44,47800	,000	
Paaren 13		Delta Flow CAST® pos1 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos1	40,69400	,001	
Paaren 14		Delta Flow CAST® pos2 - Delta CRTH2+/CD203c+ pos2	8,16600	,054	
Paaren 15		Delta Flow CAST® Allergen - Delta	48,19600	,000	

## Anhang

---

	CRTH2+/CD203c+ Allergen		
Paaren 16	Delta Flow CAST® pos1 - Delta IgE+/CD203c+ neg	45,64000	,000
Paaren 17	Delta Flow CAST® pos2 - Delta IgE+/CD203c+ neg	11,97000	,003
Paaren 18	Delta Flow CAST® Allergen - Delta IgE+/CD203c+ neg	51,39300	,000
Paaren 19	Delta Flow CAST® pos1 - Delta CD203c+ pos1	37,18400	,001
Paaren 20	Delta Flow CAST® pos2 - Delta CD203c+ pos2g	5,56500	,059
Paaren 21	Delta Flow CAST® Allergen - Delta CD203c+ Allergen	40,13100	,000

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten B. Schmidt-Weber, Leiter des Zentrums für Allergie und Umwelt der Technischen Universität und des Helmholtz Zentrums München, für die Möglichkeit an den genannten Einrichtungen zu promovieren.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Bernadette Eberlein für die Vergabe des Dissertationsthemas, die kontinuierlich begleitende und stets konstruktive Betreuung sowie die schnelle und detaillierte Korrektur meiner Dissertation bedanken. Die gemeinsame Erarbeitung der Laborprotokolle und der Vergleichsversuche wie auch die anschließende Einordnung der Ergebnisse waren für mich sehr bereichernd und der erste Einblick in experimentell-wissenschaftliches Arbeiten.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jeroen Buters für die Kooperation mit Frau Prof. Eberlein für mein Dissertationsthema, das warme Willkommen in seiner wissenschaftlichen Gruppe und die Möglichkeit nach Antwerpen in das Labor von Herrn Prof. Dr. D.G. Ebo zu fahren. Ebenso danke ich Frau Gudrun Pusch für die geduldige Einführung in die Laborarbeit sowie Herrn Davide Pennino und Frau Dr. rer. nat. Stefanie Eyerich für die Einarbeitung in die FACS-Analyse und die konstruktiven Diskussionen über das passende Versuchsprotokoll. Auch bei allen weiteren Mitarbeitern im ZAUM, insbesondere bei den selbstlosen Blutspendern möchte ich mich bedanken.

Tiefe und herzliche Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meinen Eltern, die mich in meinem beruflichen und persönlichen Werdegang immer mit größtem Einsatz und Energie auch in schwierigen Zeiten begleiten. Insbesondere danke ich meinem Bruder Moritz für seinen Beistand und unendliche Geduld bei meinen vielen Fragen zur Text- und Bildbearbeitung. Abschließend danke ich bei meinem Freund Axel für die durchgehende mentale Unterstützung und Rücksicht an den vielen arbeitsreichen Wochenenden.