

Fakultät für Medizin



Zentrum für Allergie und Umweltmedizin (ZAUM) Technische Universität  
und Helmholtz Zentrum München in Kooperation mit der HNO-Abteilung  
des Klinikums rechts der Isar

# **BIOMARKER UND LYMPHOZYTEN- POPULATIONEN IN SPUTUM UND NASALEM SEKRET VON ALLERGISCHEN ASTHMATIKERN**

Moritz Alexander Ulrich

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber
2. Prof. Dr. Tilo Biedermann
3. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 16.01.2019 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.01.2020 angenommen.



# Inhalt

1	Abstract/Zusammenfassung .....	11
2	Einleitung .....	12
2.1	Allergisches Asthma bronchiale .....	12
2.1.1	Definition von Allergie und Asthma bronchiale .....	12
2.1.2	Die Klinik und Therapie des allergischen Asthma bronchiale .....	13
2.1.3	Epidemiologie und Sozioökonomie von Allergie und Asthma bronchiale .....	18
2.2	Zelluläre Physiologie der Allergie in der Lunge .....	19
2.2.1	T-Lymphozyten .....	22
2.2.2	B-Lymphozyten .....	24
2.2.3	NK-Zellen .....	25
2.3	Sputuminduktion .....	26
2.4	Fragestellung und Zielsetzung .....	27
2.5	Ethik .....	27
3	Material und Methoden .....	28
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	28
3.1.1	Verwendete Geräte .....	28
3.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	29
3.1.3	Verwendete Reagenzien .....	29
3.1.4	Verwendete Puffer .....	30
3.1.5	Verwendete Software und Datenbanken .....	31
3.2	Studienkollektiv .....	31
3.3	Studiendesign .....	32
3.4	Klinische Patienteninformationen .....	34
3.5	Sputuminduktion .....	36

3.6	Prozessierung des Sputums .....	39
3.7	Zytospin-Technik .....	40
3.8	Durchflusszytometrie .....	42
3.9	Elektrochemilumineszenz.....	45
3.10	Statistik .....	46
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Klinische Messungen und Umweltdaten .....	47
4.1.1	Anamnestische Daten und Allergiediagnostik .....	47
4.1.2	Lungenfunktionsmessungen.....	48
4.1.3	Lebensqualität und subjektives Stresserlebnis bei Asthma bronchiale ...	49
4.2	Zelluläre Diagnostik.....	53
4.2.1	Leukozytenzählung.....	53
4.2.2	Zelldifferenzierung .....	54
4.2.3	Durchflusszytometrie .....	57
4.3	Proteinbestimmung in sekretorischen Flüssigkeiten der unteren und oberen Atemwege .....	62
5	Diskussion.....	78
5.1	Zusammenfassung.....	78
1.1.	Diskussion von Material und Methoden .....	79
1.2.	B-Zellen korrelieren mit lokalen Th2- Zytokinen .....	81
1.3.	NK-Zellen korrelieren mit lokalen Th2- Zytokinen und Eosinophilie.....	87
1.4.	Regulatorische T-Zellen im Sputum .....	89
1.5.	Die klinischen Aspekte der saisonalen allergischen Asthmatiker.....	92
6	Anhang.....	96
6.1	Einschlusskriterien .....	96
6.2	Ethikvotum.....	99
6.3	Probandeninformation .....	109
6.4	Publikationen und Kongressbeiträge.....	113

7	Literaturverzeichnis.....	124
8	Danksagung.....	141

# Abkürzungen

Abgesehen von Abkürzungen des Dudens (26. Auflage, Dudenverlag 2013), den Einheiten des internationalen Einheitensystems sowie den Symbolen für chemische Elemente und Verbindungen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AiS	Asthmatiker "in season"
AIT	Allergenspezifische Immuntherapie
AoS	Asthmatiker "out of season"
APC	Antigen presenting cell
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Breg	B-regulatorische Zelle
CD	Cluster of differentiation
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DM	Deutsche Mark
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität
FSC	Forward scatter
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
HC	Healthy Controls
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
kUA	Kilo-units Antikörper
l	Liter
MEF	Mid expiratory flow
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
Mrd	Milliarden
NaCl	Natriumchlorid/Kochsalz
NK-Zelle	Natural-Killer-Zelle
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PSQ	Perceived Stress Questionnaire
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristics

rpm	Rotations per minute
RQLQ	Rhinitis quality of life questionnaire
SIT	Spezifische Immuntherapie
SEM	Standardfehler
SSC	Sideward scatter
Sx1	Immuncap-Test für Aeroallergene
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tripropylamin
Treg	T-regulatorische Zelle
TSLP	Thymic stromal lymphopoetin
TU	Technische Universität
UA	Units of antibodies
UBA	Umweltbundesamt
VC	Vitalkapazität

## Tabellen-Verzeichnis

Tabelle 1: GINA-Asthmakontrollgrad .....	16
Tabelle 2: Asthma-Stufentherapie .....	17
Tabelle 3: Geräte .....	28
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien .....	29
Tabelle 5: Reagenzien .....	29
Tabelle 6: Antikörper .....	30
Tabelle 7: Software .....	31
Tabelle 8: Datenbanken .....	31
Tabelle 9: Erhobene Lungenfunktionsparameter .....	34
Tabelle 10: Prick-Test Allergene .....	35
Tabelle 11: Unterkategorien des RQLQ .....	36
Tabelle 12: Antikörper mit Zielantigen, Farbstoff und eingesetzter Verdünnung.....	43
Tabelle 13: Mesoscale Panel .....	46
Tabelle 14: Probandencharakteristika .....	47
Tabelle 15: Lungenfunktionswerte bei Asthmatikern .....	48
Tabelle 16: Zelllast und Zelldifferenzierung .....	55

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Bronchus .....	15
Abbildung 2: Übersicht der sezernierten Biomarker durch innate Zellen, erworbene Immunzellen und Epithelzellen.....	21
Abbildung 3: Pollenflug .....	33
Abbildung 4: Geräte zur Sputuminduktion.....	37
Abbildung 5: Schematischer Prozessablauf einer klinischen Probandenvisite .....	38
Abbildung 6: Sputumplaques.....	39
Abbildung 7: Auszählungsschema eines Objektträgers .....	41
Abbildung 8: Gating-Schema auf einzelne Zellen, Lymphozyten und lebenden Zellen .....	44
Abbildung 9: Gating-Schema für einzelne Subpopulationen in der Durchflusszytometrie .....	45
Abbildung 10: Lungenfunktionsdaten .....	49
Abbildung 11: RQLQ-Gesamtsumme.....	50
Abbildung 12: PSQ-Wert .....	51
Abbildung 13: Die RQLQ-Gesamtsumme korreliert mit dem PSQ-Wert. ....	52
Abbildung 14: Fragebogenergebnisse des (a) RQLQ und (b) PSQ korrelieren mit dem GINA-Score. ....	52
Abbildung 15: Die PSQ-Gesamtsumme korreliert am stärksten mit der PSQ- Untergruppe Aktivitätseinschränkung. ....	53
Abbildung 16: Leukozytenzählung.....	54
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der Leukozytenpopulationen .....	56
Abbildung 18: Die RQLQ-Gesamtsumme korreliert signifikant positiv mit (a) den Eosinophilen Granulozyten und (b) den Neutrophilen Granulozyten..	57
Abbildung 19: Lymphozytenpopulationen im Sputum bei Durchflusszytometrie. ....	58



Abbildung 20: Korrelation von CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> in CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> mit Lymphozytenpopulationen .....	59
Abbildung 21: Korrelation von CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> -Zellen mit Allergiediagnostik .....	60
Abbildung 22: Korrelation von CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> mit klinischen Parametern	61
Abbildung 23: Konzentration von Th1-Cytokin (IFN-g) in nasalem Sekret (a) und Sputum (b) .....	62
Abbildung 24: Konzentration von Th2-Cytokinen (IL-13, IL-4 und IL-5) in nasalem Sekret.....	63
Abbildung 25: Konzentration von (a) IL-13 im nasalen Sekret und (b) IL-13 im Sputum sowie (c) IL-4 im nasalen Sekret von Asthmatikern „out of season“ (AoS) und „in season“ (AiS) mit Verbindungslinien. ....	65
Abbildung 26: Konzentration von Th17-Cytokinen (IL-17, IL-22) .....	66
Abbildung 27: Konzentration von antiinflammatorischen Cytokinen (IL-10).....	67
Abbildung 28: Konzentration von proinflammatorischen lokalen Cytokinen mit epithelialer Abstammung (Eotaxin-3, G-CSF, IL-33, TNF-a und Periostin) .....	68
Abbildung 29: Konzentration von proinflammatorischen lokalen Cytokinen aus Infiltrat oder epithelialer Abstammung (IL-24, IL-8).....	70
Abbildung 30: Korrelation zwischen Zellpopulationen der zytologischen Differenzierung und Proteinmengen in den Sputumüberständen. ....	71
Abbildung 31: Korrelation von Eotaxin-3 zur Allergiediagnostik.....	72
Abbildung 32: Korrelation von CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> Tregs und Sputum Biomarkern.....	73
Abbildung 33: Korrelation der Quaddeldurchmessers im Gräserpollen-Pricktest mit den nasalen Spiegeln von IL-24.....	73
Abbildung 34: Korrelation von NK-Zellen mit IL-24.....	74
Abbildung 35: Korrelation von Biomarkern in oberen und unteren Atemwegen.....	74
Abbildung 36: Korrelation von Biomarkern mit B-Zellen im Sputum. ....	75
Abbildung 37: B-Zellen (CD19 <sup>+</sup> ) im Sputum korrelieren mit der IL-10-Konzentration im Sputum. ....	75

Abbildung 38: ROC-Analyse der lokalen Proteine zur Klassifizierung in die Gruppe der Asthmatiker oder Kontrollprobanden. ....	76
Abbildung 39: ROC-Analyse von IL-24 im Sputum zur Klassifizierung in GINA>0 und GINA<0 .....	77

# 1 Abstract/Zusammenfassung

Hintergrund: Die Atemwegsentzündung spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas. Zuletzt wurde die Untersuchung des induzierten Sputums als einfache und wenig invasive Methode anerkannt um die Atemwegsentzündung zu messen. Die Multicolor-Durchflusszytometrie und ein Elektrochemilumineszenz-Assay ergänzen dabei die Methode des induzierten Sputums um eine genaue Identifikation von Lymphozytenpopulationen und Biomarkern.

Ziel: Im Mittelpunkt stand die Untersuchung von Atemwegssekreten der oberen und unteren Atemwege zur Bestimmung von Th2-Markern und ihrer Korrelation mit B-, T- und NK-Zell-Frequenzen sowie klinischen Parametern.

Methoden: Induzierte Sputa von gesunden Kontrollen und allergischen Asthmatikern in und außerhalb der Saison wurden mit Dithiotreitol prozessiert um zellfreie Überstände zur Proteinmessung sowie Zell-Pellets zu gewinnen. Die Zell-Pellets wurden zur Zelldifferenzierung und Durchflusszytometrie mittels monoklonaler Antikörper verwendet. Zudem wurde das Serum-IgE bestimmt und nasale Sekrete zur Proteinmessung gesammelt.

Ergebnis: In den oberen Atemwegen allergischer Asthmatiker wurde eine starke Hochregulierung der B-Zellen und NK-Zellen in der Gräserpollen-Saison im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen. NK-Zellen korrelierten dabei mit Sx1-IgE sowie IL-24 in oberen und unteren Atemwegen. Eine CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>T-regulatorische Population war bei Asthmatikern dezimiert und zeigte negative Korrelationen mit Periostin, allergiediagnostischen Parametern und Leukozytenpopulationen. IL-24, Periostin und G-CSF sind neue, vielversprechende Biomarker für die Diagnose von allergischem Asthma sowie dessen Verlauf und Kontrollgrad.

## 2 Einleitung

### 2.1 Allergisches Asthma bronchiale

#### 2.1.1 Definition von Allergie und Asthma bronchiale

Die Nationale Versorgungsleitlinie definiert Asthma als eine „chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion“ (Bundesärztekammer (BÄK), 2013). Man unterteilt Asthma in eine allergische und eine nicht-allergische Form (Johansson et al., 2001), wobei im Folgenden nur das allergische Asthma eine Rolle spielt.

Allergisches Asthma ist eine Krankheit aus dem atopischen Formenkreis, bei der es zu einer unkontrollierten, überschießenden Reaktion des Immunsystems auf Allergene kommt. Dabei ist Atopie definiert als „persönliche oder familiäre Veranlagung, als Antwort auf niedrig-dosierte Allergene, üblicherweise Proteine, IgE-Antikörper zu bilden und typische Symptome wie Asthma, Rhinokonjunktivitis und Ekzeme/Dermatitis zu entwickeln.“ (Johansson et al., 2004). Krankheiten des atopischen Formenkreises treten häufig gemeinsam auf. Die meisten Patienten mit allergischem Asthma leiden unter Rhinitis und auch umgekehrt kann bei Patienten mit allergischer Rhinitis oft eine Hyperreagibilität der Lunge nachgewiesen werden (Cruz et al., 2007). Eine Studie von Leynaert et al. belegt, dass 80-95% der Asthmatiker auch unter Rhinitis leiden (Leynaert et al., 2004). Der sogenannte „atopische Marsch“ beschreibt die typische Sequenz mit der Entwicklung von Neurodermitis beim Kleinkind, die über eine Rhinokonjunktivitis letztendlich in allergischem Asthma bei älteren Kindern oder Erwachsenen mündet. (Spergel & Paller, 2003). Dabei durchlaufen nicht alle Atopiker diese Sequenz.

Der Begriff Allergie wurde im Jahre 1906 erstmals verwendet, ursprünglich als freie Antwort auf ein Antigen definiert und sollte sowohl eine adäquate als auch eine inadäquate Reaktion auf ein Antigen beinhalten (Von Pirquet, 1946). Verwendet wird der Begriff mittlerweile nur noch für die überschießende, inadäquate Reaktion auf ein körperfremdes Antigen. Man unterscheidet dabei vier verschiedene Untertypen, Typ

I-IV (Janeway, Travers, Walport, & Shlomdrik, 2005). Der häufigste Typ ist der IgE-vermittelte Soforttyp auch „anaphylaktischer Typ“ oder „Typ I“ genannt. Dieser liegt im Falle von allergischen Reaktionen auf Aeroallergene vor. Hierbei reagiert der Körper bei erstmaligem Kontakt mit dem Antigen über das erworbene Immunsystem mit der Produktion von IgE-Antikörpern (K. Ishizaka, Ishizaka, & Hornbrook, 1966; T. Ishizaka, Ishizaka, Johansson, & Bennich, 1969; Johansson & Bennich, 1967). Die Bindung dieser IgE-Antikörper an Mastzellen ist die sogenannte Sensibilisierung (Galli & Tsai, 2012). Bei jedem weiteren Kontakt mit eben diesem Antigen kann nun eine inadäquate Antwort des Immunsystems erfolgen, eine allergische Reaktion ist möglich. (Janeway et al., 2005)

Grundlegend für das Verständnis ist es, das allergische Asthma als inflammatorischen Prozess zu betrachten. In der allergischen Entzündung spielen dabei das Epithel, wie auch Immunzellen sowie deren Interaktion eine wichtige Rolle. Dabei werden sowohl von Leukozyten, darunter eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten sowie dem Atemwegsepithel Zytokine gebildet, die ein orchestriertes Zusammenspiel in der Pathogenese von allergischem Asthma bilden. Diese Mediatoren können in den unteren und oberen Atemwege mit Hilfe von Sputumüberständen und Nasensekreten analysiert werden (Gharib et al., 2011; Tomazic et al., 2014). Dabei tritt eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten bei allergischem Asthma sowie bei allergischer Rhinitis auf (Fahy, 2009). Erhöhte Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten im Sputum wurden dagegen gehäuft bei mittlerem bis schwerem Asthma nachgewiesen (Fahy, 2009). Es wurde auch gezeigt, dass neutrophile Granulozyten die vorherrschenden Entzündungszellen bei plötzlichen, tödlichen Asthmaanfällen sind (Sur et al., 1993).

## **2.1.2 Die Klinik und Therapie des allergischen Asthma bronchiale**

Leitsymptom des Asthma bronchiale ist eine anfallsartige Luftnot mit expiratorischem Stridor. Dazu kommen Unwohlsein, trockener Husten und Verschleimung sowie Atemnot. Die Symptome reichen dabei bis zum Ventilationsdefizit und einer damit einhergehenden vitalen Gefährdung. Diese

Symptome treten bei allergischem Asthma primär bei Antigenexposition und im Tagesverlauf vorwiegend in den Nacht- und frühen Morgenstunden auf (Bateman et al., 2008). Je nach vorliegender Allergie sind die Symptome saisonal wie beispielsweise bei Pollen-Allergikern oder nicht-saisonal wie bei Allergien gegen Tierhaare, Schimmel oder Hausstaubmilben. Gemeinsam ist den verschiedenen Typen des Asthmas dabei die „Atemwegs-Hyperreaktivität“, die eine inadäquate Reaktion der Atemwege, vor allem der Bronchien, auf unspezifische äußere Reize meint (Postma & Kerstjens, 1998). Außerdem kommt es (Abb. 1) zur endobronchialen Obstruktion durch Kontraktion der glatten Muskeln der Bronchialwand, Hypersekretion von Schleim durch hyperplastische Becherzellen, sowie einem Schleimhautödem (Bousquet, Jeffery, Busse, Johnson, & Vignola, 2000). Langfristig kommt es zu einem Umbau des Atemwegsepithels, dem sogenannten „Remodeling“. Im Rahmen dieses Prozesses wird die Obstruktion vor allem durch die Hypertrophie von Becherzellen und glatter Muskulatur verstärkt (Al-Muhsen, Johnson, & Hamid, 2011). Auch die Angiogenese durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren scheint den langfristigen Umbau der Atemwege zu verstärken (Makinde, Murphy, & Agrawal, 2006). Die Verdickung der epithelialen retikulären Basalmembran, die oft als „subepitheliale Fibrose“ referenziert wird, ist eher eine Einlagerung von Retikulin und damit keine Fibrose im herkömmlichen Sinne (Jeffery, 2001). Durch die Limitierung der Verdickung auf die Basalmembran ist die räumliche Ausdehnung in das endobronchiale Lumen begrenzt und scheint daher weniger Einfluss auf den langfristigen Verlauf der Obstruktion zu besitzen.

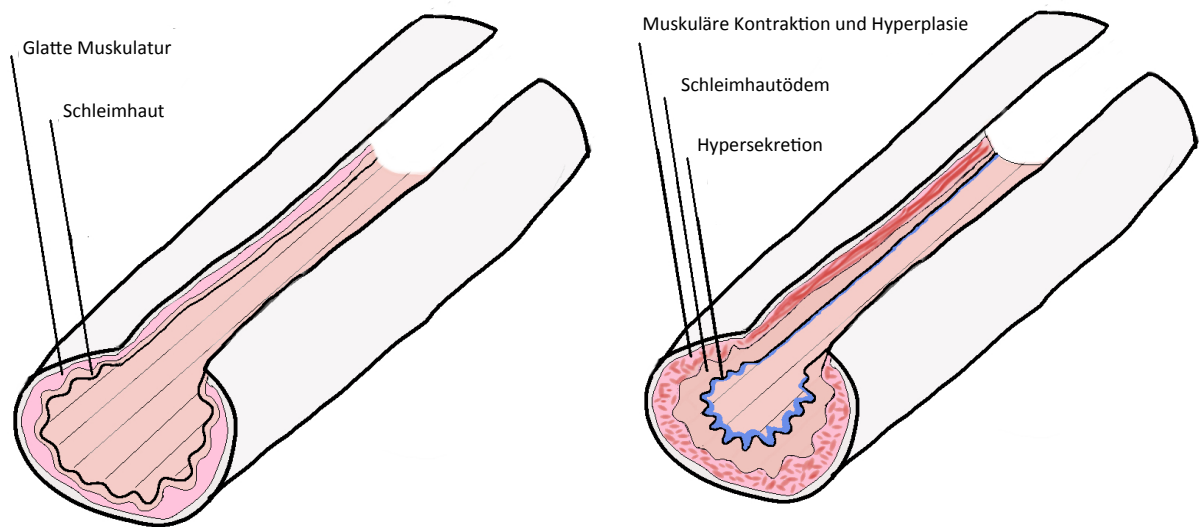


Abbildung 1: **Schematische Darstellung eines Bronchus** in physiologischem Zustand (links) und bei einem Asthmatiker mit Obstruktion (rechts).

Zur Diagnosestellung sollten zunächst Anamnese und körperliche Untersuchung erfolgen. Dazu sollten die genauen Beschwerden mit ihrem Auftretensmuster und verschlimmernde sowie verbessernde Maßnahmen genannt werden. Eine atopische Neigung in der Familienanamnese, sowie verschiedene Umweltfaktoren wie Nikotinkonsum, Haus- und Arbeitsumfeld, bekannte Allergien, Medikamente und Vorerkrankungen sollten ebenso abgefragt werden. Vor allem episodisch auftretende, reversible Beschwerden mit expiratorischem Stridor und atopischer Vorgeschichte sprechen dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Diagnose Asthma (NETWORK, 2016). In der körperlichen Untersuchung kann ein verlängertes Expirium mit Giemen oder Brummen und ein abgeschwächtes Atemgeräusch auskultiert werden. In der Perkussion fallen ein hypersonorer Klopfeschall sowie ein tiefstehendes, minderbewegliches Zwerchfell auf. Anschließend sollte eine Lungenfunktionstestung erfolgen. Es handelt sich um eine obstruktive Ventilationsstörung mit einem altersentsprechend verminderten Tiffeneau-Index, der Quotient aus Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) und Vitalkapazität (VC). Außerdem muss

eine Reversibilität der Atemwegsstörung vorliegen, die mit einem FEV<sub>1</sub>-Anstieg um, je nach Quelle, mindestens 12% bzw. 15% nach Salbutamolgabe und/oder 4 Wochen altersentsprechend dosierter inhalativer Steroidtherapie bewiesen ist (Pellegrino et al., 2005). Im Anschluss sollte eine Abklärung der erfolgten Sensibilisierung mittels Prick-Test und allergenspezifischem IgE im Serum zur Allergieabklärung erfolgen (van Kampen et al., 2013). Die Differentialdiagnosen des Asthma bronchiale neben COPD und infektiologischen Lungenerkrankungen sind zahlreich und sollten vor Diagnosestellung ausgeschlossen werden. Vor allem anhand der Lungenfunktionskriterien in Zusammenschau mit einer plausiblen Anamnese, typischer körperlicher Untersuchungsbefunde und keiner wahrscheinlicheren Differentialdiagnose kann die Diagnose Asthma bronchiale gestellt werden (Bundesärztekammer (BÄK), 2013).

Klinisch kann bei Erstdiagnose der Asthma-Schweregrad anhand der Kriterien der Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma ermittelt werden, entscheidend für die Therapie und den Langzeitverlauf ist jedoch der Asthmakontrollgrad nach GINA (Bateman et al., 2008).

Tabelle 1: GINA-Asthmakontrollgrad adaptiert nach Bateman et al., 2008.

	Symptome tagsüber	Einschränkung von Alltagsaktivitäten	Nächtliche Symptome oder Erwachen	Notwendigkeit von Bedarfsmedikation oder Notfallbehandlung	Lungenfunktion (FEV <sub>1</sub> -Soll oder PEF-Bestwert)	Exazerbation
Kontrolliertes Asthma (Alle Kriterien)	≤2x/Woche	nein	nein	≤2x/Woche	normal	keine
Teilweise kontrolliertes Asthma (>= 1 Kriterium)	>2x/Woche	ja	ja	>2x/Woche	<80%	max 1x/Jahr
Unkontrolliertes Asthma	> zwei Kriterien aus teilweise kontrolliertem Asthma oder wenn eine Exazerbation pro Woche stattfindet					

Die Asthma-Therapie beruht auf einem Stufenprinzip (Tabelle 2). Dabei wird in bestimmten zeitlichen Abständen der Asthma-Kontrollgrad des Patienten bestimmt und bei mangelnder Kontrolle auf das nächste Level der Therapie eskaliert. Die Therapie besteht dabei aus (in dieser Reihenfolge) kurzwirksamen beta2-Agonisten (rapid acting beta2-agonist = RABA) per inhalationem bei Bedarf, inhalativen Kortikosteroiden (ICS), langwirksamen beta2-Agonisten (long acting beta2-agonist = LABA) per inhalationem und Glukokortikoiden per os. Ab Stufe 4 kann Tiotropiumbromid, ein langwirksames Anticholinergikum, per inhalationem eingesetzt werden. Als zusätzliche Eskalation kann in Stufe 5 noch auf Biologicals, wie zum Beispiel der Anti-IgE-Antikörper Omalizumab, zurückgegriffen werden (Bundesärztekammer (BÄK), 2013; Schulze, 2011). Bei Kindern verwendet man



anstatt LABA einen Leukotrienrezeptor-Antagonisten, wie Montelukast, per inhalationem (Bisgaard et al., 2005).

Tabelle 2: Asthma-Stufentherapie adaptiert nach Bateman et al., 2008.

Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5
				Orale Glukokortikoide
		wahlweise LABA	LABA	LABA
	ICS niedrige Dosis	ICS niedrige bis mittlere Dosis	ICS mittlere bis hohe Dosis	ICS mittlere bis hohe Dosis
RABA	RABA	RABA	RABA	RABA

Der einzig kurative Ansatz einer Allergie ist die allergenspezifische Immuntherapie (AIT), die aber keinen Ersatz für die oben genannte Pharmakotherapie darstellt. Dabei werden dem Patienten aufsteigende Dosen des aufgereinigten, konzentrierten Allergens subkutan (SCIT) oder sublingual (SLIT) verabreicht. Eine Expertengruppe des EAACI sieht nur unkontrolliertes Asthma, aktive Neoplasien, AIDS, Schwangerschaft und ein Alter von unter zwei Jahren als absolute Kontraindikation (Pitsios et al., 2015). Eine Cochrane-Metaanalyse kam zu dem Ergebnis, dass eine signifikante Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität und des Medikamentenverbrauchs ohne Einfluss auf die Lungenfunktion nachweisbar ist (Abramson, Puy, & Weiner, 2010). Auch bei Pollenallergikern konnte eine reduzierte Sofort- und Spätreaktion nach bronchialer Birkenpollen-Provokation nach einem Jahr AIT gezeigt werden (Arvidsson, Lowhagen, & Rak, 2004). Für die SCIT konnte bei Kindern mit allergischem Asthma eine moderate, bei SLIT sogar eine starke Evidenz für die Verbesserung der Symptome nachgewiesen werden (Kim et al., 2013). Laut Chaker et al. war vor allem die Spätreaktion der Probanden nach SCIT reduziert und IL-4<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> doppelt positive T-Zellen waren in PBMCs erhöht (Chaker et al., 2016). Die Sicherheit und Effizienz der Gräserpollen-spezifischen SLIT wurde beispielsweise für Phleum pratense p5 (MK-7243) in einer umfangreichen Studie von 2014 bestätigt (Maloney et al., 2014). Die SLIT ermöglicht dabei eine sichere, einfache und selbstständig vom Patienten durchführbare Hyposensibilisierung.

## 2.1.3 Epidemiologie und Sozioökonomie von Allergie und Asthma bronchiale

Allergien haben eine hohe Prävalenz in der Weltbevölkerung und betreffen laut Weißbuch Allergie 2010 etwa 20% der deutschen Bevölkerung (Ring, Bachert, Bauer, & Czech, 2010). Nach einer Untersuchung im Jahre 2012 leiden auch ca. 20% der Bevölkerung in den USA an allergischen Erkrankungen (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2012). Die Lebenszeitprävalenz von Asthma bronchiale in den USA wurde 2008 mit 13% angegeben, in Deutschland betrug sie laut GEDA-Studie im selben Jahr 12% (Pleis, Lucas, & Ward, 2009; Steppuhn, Langen, Keil, & Scheidt-Nave, 2014). Hier war eine deutliche Steigerung im Vergleich zur GEDA-Studie im Jahr 2003 zu erkennen, in welcher nur 10% der Deutschen angaben, jemals Asthma bronchiale diagnostiziert bekommen zu haben (Steppuhn et al., 2014). Bei Kindern in Industriestaaten ist Asthma bronchiale sogar die häufigste chronische Krankheit (Wjst et al., 1994). Die Tatsache, dass die Symptome meistens nicht lebensbedrohlich sind und unter Allergenkarenz abklingen, erzeugen den Eindruck einer unangenehmen, aber milden Erkrankung. Dabei werden massive Einschränkungen der Lebensqualität nicht berücksichtigt, die eine Allergie für den Erkrankten bedeuten kann. Sowohl der Juckreiz bei Rhinokonjunktivitis und dem atopischen Ekzem, Atemnot bei Asthma und Nahrungsmittelallergien als auch Einschränkungen bei Freizeitaktivitäten und Lebensmitteln sowie die aufwendige medizinische Betreuung fallen dem Allergiker zur Last. Zusätzlich ist Asthma oft mit psychischen Komorbiditäten wie Depressionen, Panik- und Angststörungen, sozialer Phobie und somatoformen Störungen assoziiert (Goodwin, Jacobi, & Thefeld, 2003). Die Krankheit kann aber auch vital bedrohlich sein, vor allem in Schwellen- und Entwicklungsländern versterben noch viele Asthmatiker an akuten Exazerbationen (The Global Asthma Network, 2014).

Auch aus gesundheitsökonomischer Sicht ist allergisches Asthma ein Problem. Allergien und Asthma sind in verschiedenen Bevölkerungsgruppen in unterschiedlichen Prävalenzen zu finden. In Industriestaaten tritt es überdurchschnittlich oft auf (Heinrich et al., 2002). Zudem besteht auch allein zwischen West- und Ostdeutschland ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz von allergischem Asthma wie beispielsweise in der ECRHS-Studie der beiden

Studienzentren in Hamburg und Erfurt. Dabei variiert die Häufigkeit von Asthma in der ECRHS-Studie in Deutschland je nach Region zwischen 2,0-11,9% der Gesamtbevölkerung. (Nowak et al., 1996). Die Prävalenz von Atopie und Heuschnupfen steigt seit dem Mauerfall und gleicht sich in Ostdeutschland den westdeutschen Regionen an, während die Zahl der Asthmatiker zwischen 1991 und 1996 konstant geblieben ist (von Mutius, Weiland, Fritzsche, Duhme, & Keil, 1998). Die großangelegte ISAAC-Studie mit 156 Studienzentren in 56 Ländern konnte eine starke Schwankung in der Prävalenz von Asthma weltweit mit einem Nord-Süd und einem West-Ost-Gefälle zeigen (Asher & Weiland, 1998). Die Kosten, die ein Angestellter mit Asthma beispielsweise durch Arztkosten, Medikamente und Arbeitsausfall verursacht sind in den USA 2,5-fach höher als beim Durchschnitt aller Angestellten (Birnbaum et al., 2002). Für 1996 gibt das statistische Bundesamt die Gesamtkosten schon mit 6,66 Mrd. DM an (Statistisches Bundesamt, 2000). Dabei sind Allergien weiter auf dem Vormarsch und könnten in Zukunft bei inadäquater Behandlung vor allem durch den Hauptkostenpunkt des Asthma bronchiale, der Frühberentung, ins Gewicht fallen (Weißflog, 2001). Abgesehen vom Patientenwohl sollte auch aus den oben genannten Gründen eine möglichst frühe adäquate Therapie erfolgen und nach Möglichkeiten zur Prävention geforscht werden.

## 2.2 Zelluläre Physiologie der Allergie in der Lunge

Ein zentraler Auslöser der Entzündung der oberen und unteren Atemwege ist die IgE-vermittelte Aktivierung von Mastzellen, bei der verschiedene Leukozyten, wie Lymphozyten, Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen eine Rolle spielen (Togias, 2003). Der Mechanismus beginnt mit der Aufnahme und Präsentation eines Allergens durch antigenpräsentierende Zellen, beispielsweise dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen. Die MHC-II-abhängige Aktivierung antigenspezifischer Th2-Zellen bewirkt bei antigenspezifischen B-Zellen, beispielsweise über IL-4 und Stat-6 ein Antikörperklassen-Wechsel zu IgE und IgG<sub>4</sub> (Garraud et al., 1999; Miller, Eppinger, McConnell, Cunningham-Rundles, & Rothman, 1998; Shimoda et al., 1996). Diese Antikörper können an die Oberfläche

von Mastzellen andocken und dort bis zur erneuten Exposition mit diesem Antigen verbleiben. Dies ist die sogenannte Sensibilisierung.

Erfolgt nun der zweite Kontakt kann es zu einer Sofortreaktion und einer Spätreaktion kommen. Die Sofortreaktion ist vor allem Folge der Vernetzung der Oberflächenrezeptor-gebundenen IgE-Antikörper (Dembo & Goldstein, 1980; Kikuchi et al., 2002). Dabei kommt es innerhalb von Sekunden zur Histaminausschüttung mittels Exozytose, die eine akute Obstruktion durch Vasodilatation, vaskuläre Leckage und Bronchokonstriktion verursacht. Aber auch das Epithel wird im Laufe der Sofortreaktion durch das ausgeschüttete Histamin aktiviert und bildet pro-inflammatorische Zytokine, Leukotriene, NO und plättchenaktivierenden Faktor (PAF). Die IgE-vermittelte Ausschüttung von Mediatoren durch aktivierte Mastzellen ist wesentlicher Teil der Sofortreaktion, auf die nach 2-4 Stunden eine Spätreaktion folgt, die bis zu 24 Stunden dauern kann (O'Byrne, Dolovich, & Hargreave, 1987).

Die Spätreaktion beruht auf einer Ausschüttung von Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-13 und IL-3, GM-CSF und TNF (Kay et al., 1991) sowie von Lipidmediatoren wie Prostaglandin D<sub>2</sub> und Leukotrien C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> durch induzierte Mastzellen, Basophile und Th<sub>2</sub>-Zellen. Leukotriene bewirken eine allgemeine Konstriktion von glatten Muskelzellen und dadurch eine Bronchokonstriktion sowie intestinale Hypermotilität (Dahlen, Hedqvist, Hammarstrom, & Samuelsson, 1980). Auch ein Gewebsödem, eine erhöhte Schleimproduktion und eine inflammatorische Reaktion durch Chemotaxis von Eosinophilen werden durch Leukotriene gefördert (Drazen, Israel, & O'Byrne, 1999; Henderson et al., 1996).

Gerade die Rolle des Epithels mittels Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren wie Zytokinen, Chemokine und Lipidmediatoren ist entscheidend für die Pathogenese des Asthma (Abb. 2.). So wird beispielsweise IL-33 von Epithelzellen sezerniert und unter anderem über die Aktivierung von Th<sub>2</sub>-Zytokinen und Chemotaxis Th<sub>2</sub>-polarisierter Zellen direkt an der Spätreaktion beteiligt (Kurowska-Stolarska et al., 2008; Rogala & Gluck, 2013). Das ebenfalls epithelial sezernierte Eotaxin-3 ist eher als Chemokin zur Anlockung eosinophiler Granulozyten in der Spätphase beschrieben (Ravensberg et al., 2005). Periostin, ebenfalls vom Epithel sezerniert, stimuliert Fibroblasten und spielt eine Rolle im Remodeling der Atemwege (Takayama et al., 2006).

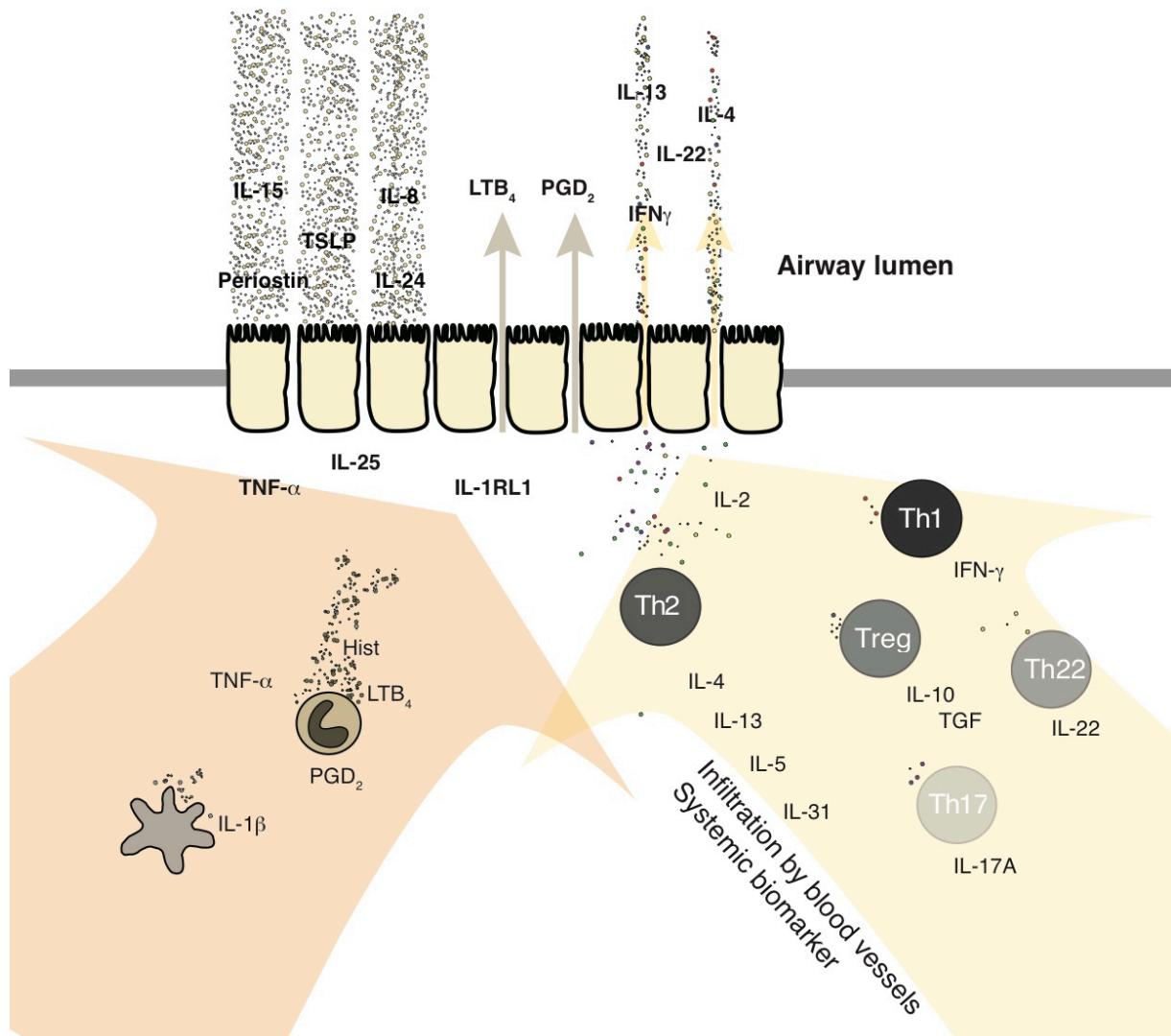


Abbildung 2: **Übersicht der sezernierten Biomarker durch innate Zellen, erworbene Immunzellen und Epithelzellen** Die Epithelzellen können die dabei sowohl nach apikal als auch nach basal sezernieren. Abbildung adaptiert nach (U. M. Zissler, Esser-von Bieren, Jakwerth, Chaker, & Schmidt-Weber, 2016)

Die Immunantwort wird entsprechend der in Abb. 2 dargestellten T-Helferzellen (Th) in eine IFN- $\gamma$ -dominierte Th1- und eine IL-4-dominierte Th2- Antwort eingeteilt (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin, & Coffman, 1986; U. M. Zissler, Chaker, et al., 2016). Diese Th2-Zytokine wirken direkt auf Leukozyten, darunter Mastzellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, sowie T-Zellen und B-Zellen. Die ausgeschütteten Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 bewirken auf lange Sicht auch eine chemotaktisch vermittelte Entzündung mit einem „Airway Remodeling“, das zum fibrotischen sowie emphysematischen Umbau des Lungengewebes führen kann (Al-Muhsen et al., 2011).

## 2.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind essentieller Bestandteil des erworbenen Immunsystems und für den zellvermittelten Teil der Immunantwort verantwortlich. Die T-Zelle wird durch den T-Zell-Rezeptor definiert, der auf MHC-Molekülen präsentierte Antigene erkennt (Janeway et al., 2005). Zytotoxische T-Zellen erkennen über den Co-Rezeptor CD8 auf MHC-I gebundene Antigenfragmente eines intrazellulären Erregers (Zinkernagel et al., 1978). Anschließend bewirkt die aktivierte CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zelle die Zerstörung der infizierten Zelle über beispielsweise Perforine und Granzyme.

Im Gegensatz dazu nehmen antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen extrazelluläre Proteine auf und präsentieren Protein-Fragmente auf MHC-II-Molekülen an der APC-Zelloberfläche (von Boehmer, Haas, & Jerne, 1978). Mittels des T-Zell-Rezeptors und des Co-Rezeptors CD4 wird nun die T-Helferzelle aktiviert. Diese agiert vor allem über die Ausschüttung von Zytokinen, welche Leukozyten anlocken, aktivieren, sowie die Immunantwort modulieren können. Aktivierte T-Zellen exprimieren CD69, welches die Oberflächenexpression des S1PR1-Rezeptors der T-Zelle unterdrückt und darüber eine längere Verweil- und Reifedauer in den lymphoiden Organen ermöglicht (Matloubian et al., 2004). Nach erfolgter Zellteilung einer T-Zelle sinkt deren CD69-Expression wieder und ermöglicht deren Austritt aus dem Organ (Pham, Okada, Matloubian, Lo, & Cyster, 2008).

Die einzelnen Klassen der Effektor-T-Helferzellen bewirken dabei unterschiedliche Typen der Inflammation. Th1-Zellen sezernieren vor allem das pro-inflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  (Abb. 2). Interferon- $\gamma$  aktiviert B-Zellen und induziert einen Isotypen-Wechsel zu IgG-Subtypen, wobei die Bildung von IL-4-assoziiertem IgE inhibiert wird. Ein Gegengewicht zu Th1-Zellen stellen Th2-Zellen dar, die sich physiologisch in einem Gleichgewicht befinden. Th2-Zellen sezernieren vor allem die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Abb. 2). Interleukin-4 stimuliert autokrin die Differenzierung und Entwicklung von Th2-Zellen. Abgesehen von dieser Funktion besitzen IL-4 und IL-13 eine gemeinsame Wirkung: zusammen erhöhen sie die Mukussekretion in Darm und Atemwegen, stimulieren die Chemotaxis von Leukozyten und bewirken einen Isotypen-Wechsel bei B-Zellen zugunsten von IgE und IgG4 (Del Prete et al., 1988).

Ein dritter Subtyp der T-Helferzelle ist Th17-Zelle, die vor allem IL-17 und IL-22 sezerniert. IL-17 ist größtenteils für die Induktion einer Entzündung mittels neutrophiler Granulozyten verantwortlich, deren Wirkpotenzial sich vor allem gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze richtet.

Entscheidend ist jeweils ein positiver Feedback-Mechanismus, den die 3 unterschiedlichen Zytokin-Milieus etablieren. Dabei wirken die Zytokine schicksalsentscheidend auf Transkriptionsebene. So fördern, nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe, Th1-Zellen mit ihrem spezifischen Zytokinmuster, darunter vor allem IFN- $\gamma$ , die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen und lenken die Entzündung in ihre Richtung (U. M. Zissler, Chaker, et al., 2016). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet führt dabei zu einer vermehrten Entstehung von Th1-Zellen und inhibiert beispielsweise die Proliferation von Th2-Zellen (Gajewski & Fitch, 1988). Gleiches gilt für GATA3 und Th2-Zellen sowie ROR $\gamma$ t und Th17-Zellen. Auf klinischer Ebene wird bereits ein GATA-3-spezifisches DNA-Enzym erprobt, welches die Th2-Antwort nach dessen Inhalation lokal vermindern soll (Krug et al., 2015).

T-regulatorische Zellen (Tregs), inhibieren die Immunantwort und verstärken die Selbsttoleranz. Entdeckt wurden sie durch die Beobachtung, dass durch Eradikation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen (CD25 ist die alpha-Kette des IL-2-Rezeptor) eine Autoimmunität induziert werden konnte (Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995). Letztendlich stellte sich heraus, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nur einer von 4 T-regulatorischen Zelltypen, darunter T<sub>R</sub>-Zellen, Th3 und NKT-Zellen ist (Akbari, Stock, DeKruyff, & Umetsu, 2003). Als standardisierte Phänotypisierung der T-regulatorischen Zelle wird CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> verwendet. Für diese Zellpopulation gibt es die beste Datenlage zu ihrer regulatorischen Rolle. Unter Zuhilfenahme von CD 127 konnten Yu et al. zeigen, dass die Zellen mit der höchsten Produktion des essentiellen Transkriptionsfaktors FOXP3 als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Zellen beschrieben werden konnten (Yu et al., 2012). T-regulatorische Zellen sezernieren die anti-inflammatorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10. An dieser Stelle sei besonders IL-10 hervorgehoben, da es dem oben erwähnten Th1-Milieu über die Inhibition der IL-12-Produktion entgegenwirkt und eine Aktivierung von T-Helfer-Zellen durch eine Inhibition der MHC-II-Expression vermindert. Außerdem konnte eine inhibitorische Wirkung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen mittels IL-10

auf eine Th2-Reaktion nachgewiesen werden. (Kearley, Barker, Robinson, & Lloyd, 2005).

Bei Antigenkontakt bilden sich zusätzlich zu den genannten T-Effektor-Zellen immer auch Gedächtnis-T-Zellen, Memory-T-Zellen genannt, welche für Jahre persistieren können und für eine dauerhafte Immunität verantwortlich sind. Diese exprimieren eine Isoform der Tyrosinphosphatase CD45, die als CD45RO beschrieben ist und haben eine niedrige Expression von CD45RA (Clement, 1992; Seddiki et al., 2006). Aktivierte T-regulatorische Zellen besitzen meist CD45RO<sup>high</sup> (Miyara et al., 2009), können aber im Gegensatz zur Gedächtnis-Zelle nicht nur mittels der CD45-Isoform identifiziert werden. Unter anderem die IL-127-Expression determiniert nämlich ob eine T-Zelle regulatorische Funktionen übernimmt (Seddiki et al., 2006).

NK T-Zellen sind mature  $\alpha/\beta$ -positive T-Zellen, die wie NK-Zellen ebenfalls den Adhäsionsfaktor NCAM (CD56) exprimieren (Abbas et al., 2012). Sie erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors an CD1 gebundene Lipide und können über rasche Zytokinausschüttung eine Inflammation fördern (Thomas et al., 2003; Zeng et al., 1997). Dabei wurden NK T-Zell-Subpopulationen in erhöhtem Maße bei Asthmatikern nachgewiesen und korrelierten mit der Lungenfunktion (Shim & Koh, 2014).

## 2.2.2 B-Lymphozyten

Ein Fokus unserer Beobachtung liegt auf der B-Zelle bzw. dem B-Lymphozyten. Die B-Zelle ist zusammen mit der T-Zelle Teil des erworbenen Immunsystems und essentiell für die humorale Immunität (Fagraeus, 1947). B-Zellen sind als einziger Zelltyp für Produktion von Antikörpern verantwortlich. Sie können jedoch auch Aufgaben der Antigenpräsentation und Zytokinsekretion übernehmen (Lindell, Berlin, Schaller, & Lukacs, 2008). Multivalente Antigene aktivieren die B-Zelle, ohne T-Helferzellen, direkt über den B-Zell-Rezeptor. Mikrobielle Antigene können hingegen nur mit Hilfe von T-Helferzellen eine Immunreaktion hervorrufen. Nach Aktivierung kommt es zu einer Proliferation und Differenzierung der B-Zelle. Besonders unter Einfluss der T-Helferzelle wird nach B-Zell-Aktivierung ein Antikörper-Isotypen-Wechsel (von IgM/IgD zu IgG/IgA/IgE) und eine Affinitätsreifung der B-Zelle beobachtet. (Abbas et al., 2012; Janeway et al., 2005) Aktivierte B-Zellen mit hochaffinen Rezeptoren können dabei als Memory-B-Zellen persistieren und für eine



beschleunigte humorale Immunantwort bei Zweitkontakt mit dem Antigen sorgen (Dogan et al., 2009; Klein, Kuppers, & Rajewsky, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen auch Zytokine produzieren und sich in zwei Typen von Effektor-B-Zellen aufteilen. Die IFN- $\gamma$  produzierende Be1-Zelle, die eine Entwicklung der naiven T-Zelle zu Th1-Zellen und die IL-4 produzierende Be2-Zelle, die die Th2-Entwicklung begünstigt (Harris et al., 2000). Eine antiinflammatorische Wirkung wird dabei von B-regulatorischen Zellen ausgeübt. Über die Ausschüttung von IL-10, IL-35 und TGF-beta, als auch der Produktion von IgG4 wird eine Antigentoleranz erzeugt. Außerdem scheinen diese Zellen bei Immuntherapie, eventuell zur Erzeugung einer Allergentoleranz, hochreguliert zu werden (van de Veen et al., 2016).

### 2.2.3 NK-Zellen

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Das NK im Namen steht dabei für „Natural Killer“ und beschreibt deren Aufgabe viral oder bakteriell befallene Zellen abzutöten. Sie erkennen Zellen mit fehlendem Inhibitionssignal auf der Oberfläche und töten diese unter anderem mittels Perforinen und Granzymen ab (Abbas et al., 2012). Eine wichtige Rolle in der Aktivierung spielt dabei der NKG2D-Rezeptor, der Zellen erkennt, die stressinduziert MICA-Moleküle exprimieren (Bauer et al., 1999). Zusammen mit ILC1-Zellen können sie auch der Gruppe 1 der innate lymphoiden Zellen zugeordnet werden (Spits et al., 2013). Durch den (humanen) Schlüsselmarker CD56 und den fehlenden Pan-T-Zellmarker CD3 werden sie im Menschen als CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> und mittels NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> in Mäusen detektiert (Lanier, Phillips, Hackett, Tutt, & Kumar, 1986). Dabei kann man die Population noch in CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> unterteilen, die teils unterschiedliche Funktionen übernehmen (Cooper et al., 2001; Lanier, Le, Civin, Loken, & Phillips, 1986). Die CD56<sup>dim</sup>-Untergruppe exprimiert meist das Oberflächenmolekül CD16 (Romee et al., 2013), welches nicht in unserem Panel enthalten war. Das Oberflächenmolekül NKp46 kann dabei spezieübergreifend eine NK-Zelle definieren (Walzer et al., 2007). Die Rolle der NK-Zelle in der Allergie wurde meist in-vitro sowie in-vivo bei Mäusen, jedoch nicht hinreichend beim Menschen erforscht. Eine mögliche Produktion von Th2-Zytokinen durch NK-Zellen könnte auch direkt zur Immunpathogenese von allergischen Atemwegserkrankungen beitragen (Mathias, 2015).

## 2.3 Sputuminduktion

Als Sputum (lat. sputum „Auswurf, Speichel“) werden alle Sekretionen der unteren Atemwege bezeichnet (Barnes, 1997). Induziertes Sputum ist eine Methode zur nichtinvasiven Gewinnung von Proben der unteren Atemwege. Der Mechanismus der hypertonen Sputuminduktion ist noch nicht gänzlich geklärt, beruht aber wahrscheinlich auf einer erhöhten mukoziliären Clearance (Pavia, Thomson, & Clarke, 1978), einem osmotischen Effekt der hypertonen Kochsalzlösung, durch den mehr Flüssigkeit ins Atemwegslumen gelangt und einer Stimulation der Sekretion (Popov et al., 1995).

Die zellulären Anteile des Sputums bestehen vor allem aus Leukozyten wie Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen Granulozyten, Basophilen Granulozyten, Lymphozyten und einem geringen Anteil an Plattenepithelzellen. Die Entzündungszellen migrieren über das Blut und vaskuläre Epithel durch das Atemwegsepithel in das bronchiale Lumen. (Hansel & Walker, 1992). Außerdem können Salze, Lipide, freie Zellbestandteile und Bakterien vorkommen. Die Biomarker-Analyse mit Hilfe von induziertem Sputum ist dabei bei der COPD schon validiert (Barnes et al., 2006). Bei induziertem Sputum ist die Analyse zwar aufgrund der zusätzlichen Bestandteile, die zunächst mechanisch und chemisch entfernt werden müssen, erschwert, bietet aber eine wertvolle Analysemethode für die Erforschung von allergischem Asthma.

Bereits in den 1950er Jahren wurden erste Experimente mit induziertem Sputum gemacht, zunächst jedoch zur Untersuchung von Lungenkrebs und Atemwegsinfektionen (Bickerman, Sproul, & Barach, 1958) (Yue & Cohen, 1967) (Leigh et al., 1989). Die heutzutage als Goldstandard verwendete Methode wurde erstmals 1992 publiziert. Pin et al. modifizierten sie damals für Asthmatiker und verifizierten, dass induziertes Sputum eine Momentaufnahme der Entzündungssituation der unteren Atemwege bei Asthma sowie weiteren Bronchialerkrankungen ist (Pin et al., 1992). Dabei wurde die Kochsalzkonzentration von isotonischer Konzentration von 0,9% auf eine stufenweise Erhöhung von 3%, 4% und 5% angepasst. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Kochsalzkonzentration die

Erfolgsrate der Sputuminduktion signifikant erhöht (Popov et al., 1995). Um eine Bronchokonstriktion zu verhindern, ist vor Sputuminduktion eine Applikation von Salbutamol per inhalationem empfohlen (Paggiaro et al., 2002; Pizzichini, Pizzichini, Leigh, Djukanovic, & Sterk, 2002), wodurch die Zellzahl unbeeinflusst bleibt (Popov et al., 1995). Es konnte anhand der Neutrophilenzahl exemplarisch gezeigt werden, dass die Sputuminduktion eine gute Reproduzierbarkeit besitzt. Die für das allergische Asthma relevanten Zellpopulationen können hier mittels einer minimal-invasiven Methode gewonnen werden. Dabei enthält das induzierte Sputum nicht nur das Zellpellet zur Identifikation und Quantifizierung von Zellsubtypen sondern auch Überstand zur Untersuchung von Zytokinen und Proteinen (Eickmeier et al., 2010).

## 2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Diese Studie sollte ein deskriptives Bild des Entzündungsmusters in den Atemwegen anhand von Zytokinen und Zellen in den lokalen Sekreten erstellen. Besonders T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen standen dabei im Fokus und wurden mit klinischen und molekularbiologischen Untersuchungen verglichen. Im Vordergrund stand dabei die Suche nach einem Messinstrument in Form eines Biomarkers oder Zelltyps mit Aussagekraft über den aktuellen Entzündungsstatus und Vorhersagewert für Entzündung und klinischen Verlauf des allergischen Asthmas.

## 2.5 Ethik

Die Studie wurde im Zuge einer Adaptation des Ethikantrages „Effekte von Lipidmediatoren bei allergischen Erkrankungen der Atemwege“ genehmigt. Die Zulassung durch die Ethikkommission befindet sich im Anhang.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 3.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 3: Geräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Computer	MacBook Pro Retina	Apple, USA
	Dell PC	Dell, USA
Sputuminduktion und -prozessierung	Pari Turbo Boy SX	PARI, GER
	Neubauer-Zählkammer Improved	Marienfeld GmbH, GER
	Auflichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, GER
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Inkubationssystem	Titramax 101	Heidolph, GER
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, USA
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, GER
Pipetten	Eppendorf research 1000µl	Eppendorf, GER
	Eppendorf research 100µl	Eppendorf, GER
	Eppendorf research 10µl	Eppendorf, GER
	Transferpipette -8	Brand, GER
FACS	FACS Fortessa	BD, USA
Zelldifferenzierung	Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific, USA
	Leica DMRB	Leica, GER
Kühlschränke	Kühlschrank +4°C	Liebherr, GER
	Gefrierschrank Heraeus -80°-C	Thermo Fisher Scientific, USA
Wasseranlage	Milli-Q	Millipore, USA
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, GER

## 3.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Petrischalen	90mmx16,2mm Petrischale	Fisherbrand, USA
Falcon-Röhrchen	Falcon round bottom tubes	BD, USA
Zell-Filter	Cell Strainer 70µm Nylon	BD, USA
Objektträger	Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, USA
Deckgläser	No.1 25x50mm	Marienfeld, GER
Microtiterplatten	Tissue culture plate 96-well Round bottom suspension cells	SARSTEDT, GER
Pipettenspitzen	Tip One® Gratuated Filter Tip 10µl (sterile)	Star-Lab GmbH, GER
	Tip One® Gratuated Filter Tip 200µl (sterile)	Star-Lab GmbH, GER
	Tip One® Gratuated Filter Tip 1000µl (sterile)	Star-Lab GmbH, GER
	epT.I.P.S Standard 200µl	Eppendorf, GER
	epT.I.P.S Standard 100µl	Eppendorf, GER
	epT.I.P.S Standard 20µl	Eppendorf, GER
	Diamond 200µl Tip	Gilson, USA
Cytospin	Shandon Filter Cards (thick)	Thermo Fisher Scientific, USA
	Shandon Cytoclip	Thermo Fisher Scientific, USA
	Eukitt	Fluka, GER
	Xylol Isomeregemisch	Sigma-Aldrich
	Impfösen	VWR, USA

## 3.1.3 Verwendete Reagenzien

Tabelle 5: Reagenzien

Produkt	Hersteller
DPBS (1x)	Life technologies/ Thermo Fisher Scientific, USA
Eukitt	Fluka, GER
FACSClean	BD, USA
FACSRinse	BD, USA
Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Sigma-Aldrich, GER
May-Grünwald-Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Sigma-Aldrich, GER
Methanol	Merck, GER
NaCl-Lösung zur Inhalation (3%, 4%, 5%)	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
RNACellProtect reagent	Qiagen, GER
Sputolysin (DTT:H <sub>2</sub> O = 1:10)	Merck, GER
Trypanblau	Sigma-Aldrich, GER
Xylol	Sigma-Aldrich, GER

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Farbe	Hersteller
Mouse anti-human CD3	BD Horizon V500	BD, USA
Mouse anti-human CD4	BD Horizon V450	BD, USA
Mouse anti-human CD8	PE/Cy7	BioLegend, USA
Mouse anti-human CD19	Alexa Fluor 700	BioLegend, USA
Mouse anti-human CD25	FITC	BioLegend, USA
Mouse anti-human CD45	APC/Cy7	BioLegend, USA
Mouse anti-human CD56	Brilliant Violet 605	BioLegend, USA
mouse anti-human CD 69	PE	BioLegend, USA
mouse anti-human CD 127	Brilliant Violet 711	BioLegend, USA
rat anti-human CD 294	APC	BioLegend, USA
Human TruStain FcX		BioLegend, USA

### 3.1.4 Verwendete Puffer

#### Trypanblau

- 1 Teil von 4.25% NaCl in Aqua dest.
- 4 Teile von 0.2% Trypanblau in Aqua dest.

#### PBS-Puffer (10 x nach Dulbecco, pH 7,4) für 1L

- 2.0g KCl
- 2.0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 80.0g NaCl
- 21.6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
- mit aqua bidest. auf 1000 mL aufgefüllt

#### FACS-Puffer

- 475ml PBS
- 25ml FBS
- 100µl NaN<sub>3</sub>

## 3.1.5 Verwendete Software und Datenbanken

Tabelle 7: Software

Programm	Version	Hersteller
FacsDiva	8.0	BD, USA
FlowJo	v9.6.2 bis 10.2	FlowJo LLC, USA
GraphpadPrism	6 und 7	Graphpad Software, USA
Mac OS	OsX MountainLion bis macOS Sierra	Apple, USA
Microsoft Excel für Mac 2011	v14.4.6	Microsoft, USA
Microsoft Word für Mac 2011	v14.4.6	Microsoft, USA

Tabelle 8: Datenbanken

Datenbank	Internet-Adresse
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
PubMed Medline	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>

## 3.2 Studienkollektiv

Untersucht wurden zwei Patientenkollektive, Allergische Asthmatiker und Kontrollprobanden. Ein großer Teil der in dieser Studie teilnehmenden Asthmatiker hat zuvor bereits an der UBA-Studie teilgenommen. Dabei handelt es sich um eine Studie des Umweltbundesamts Deutschland in Kooperation mit der RWTH Aachen und der HNO-Abteilung am Klinikum Rechts der Isar, in der 476 Probanden mit Verdacht auf allergisch bedingte Atemwegserkrankung auf Sensibilisierungen gegen Inhalationsallergene untersucht wurden. Die „Allergischen Asthmatiker“ wurden für unsere Studie als saisonale Asthmatiker, das heißt Asthmatiker mit Beschwerden innerhalb der Pollensaison, definiert und selektiert. Zusätzliches Teilnahme Kriterium in unserer Studie war vordiagnostiziertes allergisches Asthma. Mittels Aushängen und Internet-Annoncen wurden „Kontrollprobanden“ kontaktiert und ausgewählt. Es wurden, zusätzlich zu den UBA-Kriterien, Raucher aus der gesamten Studie ausgeschlossen. Da die UBA-Studie multizentrisch durchgeführt wurde ist außerdem darauf hinzuweisen, dass an unserer Studie nur Patienten aus der Region Bayern, vor allem aus der Region München, teilgenommen haben. Ziel war es, Probanden aus einer bestimmten Region mit möglichst ähnlichen Allgemeinkriterien wie Alter, BMI in den einzelnen Gruppen zu poolen um mögliche Interferenzen und Verzerrungseffekte auszuschließen. Es wurden 15 Probanden für die Gruppe der allergischen Asthmatiker und 16 Probanden für die Kontrollgruppe rekrutiert.

### 3.3 Studiendesign

Am Tag der Sputuminduktion musste jeder Teilnehmer die postalisch oder elektronisch zugesandte Probandeninformation erneut durchlesen und Fragen wurden von ärztlicher Seite beantwortet. Dann wurde die Einverständniserklärung des Patienten per Unterschrift eingeholt und vom Studienarzt gegengezeichnet. Die Allergischen Asthmatiker wurden zu zwei Zeitpunkten eingeladen. Es wurden 15 Probanden zum Zeitpunkt „in season“, der als innerhalb der Pollensaison definiert wurde, untersucht. Von diesen 15 Probanden nahmen 13 Probanden zum Zeitpunkt „out of season“, der als außerhalb der Pollensaison definiert wurde erneut an der Sputuminduktion teil. Die 16 Kontrollprobanden wurden nach den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien nur zum Zeitpunkt „off season“ gesehen und ein stabiler nichtentzündlicher Zustand im Sinne eines physiologischen „steady state“ für beide Zeitpunkte angenommen.

Die Zeitpunkte der Messung für klinische Visite und Sputuminduktion „in season“ und „out of season“ wurde mittels klinischer Erfahrung der letzten Jahre und mit Hilfe der aktuellen Messdaten der Pollensammelstation der TU München unter der Leitung von Prof. Jeroen Buters ermittelt (s. Abb. 3).



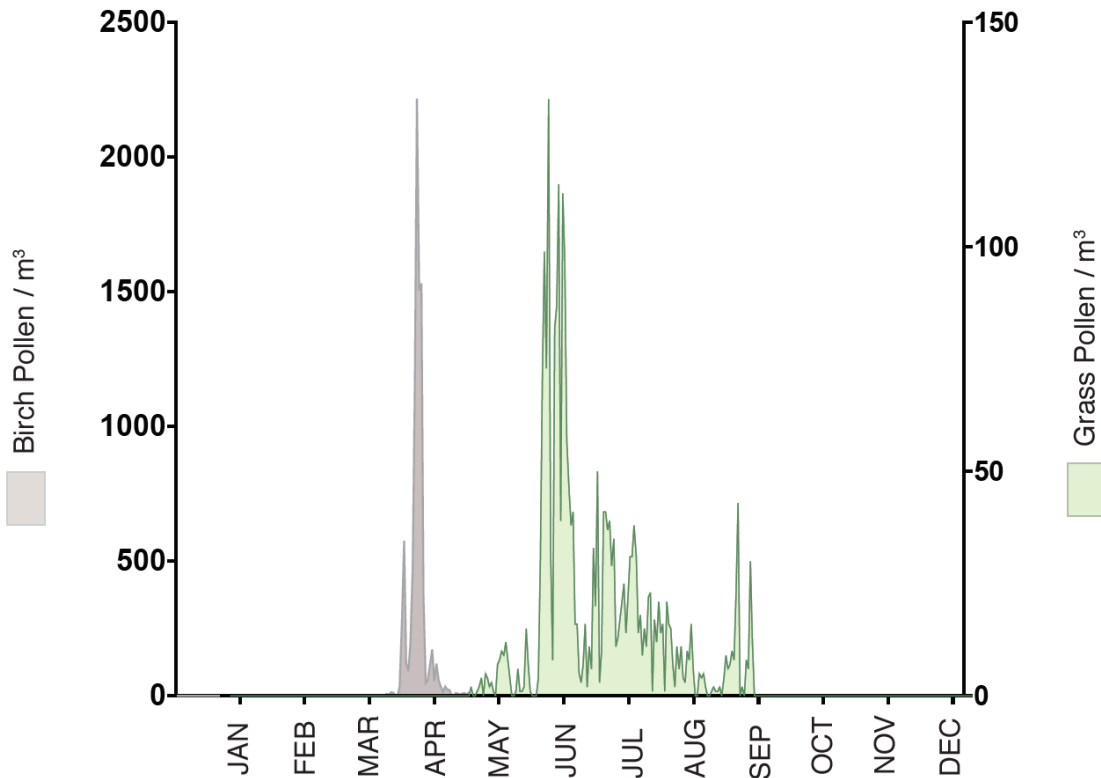


Abbildung 3: **Pollenflug** von Birkenpollen (rot) und Gräserpollen (grün) im Jahresverlauf 2013.

Die allergischen Asthmatiker wurden zu zwei Zeitpunkten innerhalb des Jahres 2013 eingeladen. Innerhalb der Gräserpollen-Saison („in season“) wurden von Mitte Juni bis Ende Juli und außerhalb der Gräserpollen-Saison („out of season“) wurden von Anfang November bis Ende Dezember Proben gesammelt. In Abb. 3 erkennt man, dass die Gräserpollen-Saison im Jahr 2013 von Mai bis Ende August stattfand und die höchsten Messwerte von Mitte Mai bis Mitte Juli erreicht wurden. Damit lagen die Zeitpunkte der Probengewinnung wie gewünscht mitten in der Gräserpollen-Saison. Man kann erkennen dass die Höhe der Birkenpollen im späten März und frühen April gipfelte. Zum Versuchszeitpunkt dieser Studie spielte der Flug der Birkenpollen höchstens eine untergeordnete Rolle. Somit beurteilen wir unsere Daten primär im Hinblick auf Gräserpollen und Gräserallergie.

Von insgesamt 44 geplanten Sputuminduktionen konnten 43 Induktionen durchgeführt werden. Nur eine einzige Sputuminduktion konnte aufgrund arterieller Hypertonie nicht begonnen werden. Bei 15 Allergischen Asthmatikern musste ein Proband wegen nicht nachweisbarem saisonalem, allergischem Asthma und Rauchen in der Vorgeschichte ausgeschlossen werden. Zwei Allergische Asthmatiker kamen nicht zur 2. Visite „out of season“. Von 16 Kontrollprobanden musste ein

Proband wegen arteriellem Hypertonus und ein Kontrollproband wegen Sensibilisierung auf Gräserallergene im Prick-Test ausgeschlossen werden.

### 3.4 Klinische Patienteninformationen

Klinische Daten wurden im Klinikum Rechts der Isar zum Zeitpunkt „in season“ und „out of season“ erhoben und schriftlich dokumentiert. Zunächst wurden systolischer und diastolischer Blutdruck sowie Herzfrequenz gemessen um mögliche kardiopulmonale Dysfunktionen oder Risiken frühzeitig, das heißt vor Gabe des beta-2-Mimetikums Salbutamol und der anschließenden Sputuminduktion, auszuschließen. Anschließend wurden drei gleichartige Lungenfunktionsmessungen durchgeführt, um mögliche Bias durch Lern-Effekte oder Non-Compliance auszuschließen. Insgesamt wurden dreimal vor Salbutamolgabe „prä Lyse“, dreimal nach Salbutamolgabe „post Lyse“ und nach jedem Inhalationsschritt Lungenfunktionswerte erhoben. Der jeweils höchste gemessene Wert wurde dokumentiert und für die Auswertung herangezogen. Mit dem mobilen Spirometer „Jäger SpiroPro“ wurden, mit durch eine Klammer verschlossener Nase, die in Tabelle 9 aufgeführten Messgrößen erhoben. Zur Berechnung der prozentualen Werte wurden Standardwerte nach Geschlecht, Alter und Physis der Firma Jäger herangezogen.

Tabelle 9: Erhobene Lungenfunktionsparameter

VC IN [L]	VC IN [%]	FVC [L]	FVC [%]	FEV <sub>1</sub> [L]	FEV <sub>1</sub> [%]	Tiffeneau	MEF 25 [L]	MEF 25 [%]
-----------	-----------	---------	---------	----------------------	----------------------	-----------	------------	------------

Nach Salbutamol-Applikation wurde ein Pricktest am Unterarm des Probanden durchgeführt. Dabei wurde je ein Tropfen des Allergens (s. Tabelle 10) auf eine markierte Stelle der Haut aufgebracht und mit einer Einmal-Lanzette pro Probe in die Haut auf der Innenfläche des Unterarms eingebracht. Nach 15 Minuten wurde der Durchmesser der gebildeten Quaddel abgelesen. Durchmesser über 3mm wurden als positiv auf dieses Allergen bewertet. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten Histamin (10mg/ml) und NaCl (0,9%).

Tabelle 10: Prick-Test Allergene

NaCl 0,9%	Histamin
Gräser	Birke
D.farinae	D. pteronyssimus
Katzenepithelien	

Im Anschluss an den Pricktest erfolgte am gegenüberliegenden Arm die Abnahme eines Serumröhrchens Heparin-Blut, mit anschließender Zentrifugation auf 8000 U/min bei 4°C für 5 min. Das Serum wurde zu je 1000µl in zwei Eppendorf-Gefäße abpipettiert und auf Eis gelagert. Die übrigen Blutbestandteile wurden mitsamt Serumröhrchen verworfen. 20 Minuten nach Salbutamolapplikation, wurde die „Lungenfunktion nach Lyse“ bestimmt und die Sputuminduktion begonnen.

Abschließend wurden Filterpapierstreifen unter Sicht, mit einem Spekulum, an die Nasenscheidewand angelegt, leicht festgedrückt und 1 Minute dort belassen. Dies geschah sukzedan auf beiden Seiten. Anschließend wurde der Papierstreifen entfernt und in 350µl PBS (Probe Nasenloch 1) sowie 350µl Methanol (Probe Nasenloch 2) gelegt. Nun wurde die Probe bei 8000 U/min bei 4°C für 5min. zentrifugiert. Die Blutproben wurden bei -18°C eingefroren und einer Gesamt-IgE-Bestimmung sowie einem ImmunoCap Sx1 zugeführt. Im ImmunoCap Sx1 wurden Antikörper gegen folgende Inhalationsallergene nachgewiesen: Roggenpollen, Lieschgras, Birkenpollen, Beifußpollen, Cladosporium herbarum, Hausstaubmilbe (D. pteronyssimus), Katzenschuppen/-epithel, Hundeschuppen/-epithel.

Anamnestisch wurden die Teilnahme an bisherigen Studien, chronische und akute Krankheiten, Medikamenteneinnahme und aktuelle Beschwerden nach GINA-Score abgefragt. Außerdem wurden zwei Fragebögen zur Erfassung der Lebensqualität mit Allergie herangezogen. Der RQLQ (Rhinocunjunctivitis Quality of Life Questionnaire) diente der Erfassung von Symptomen und den Einschränkungen im Alltag speziell bei Symptomen an Augen und Nase. Dabei mussten 14 Items (Tabelle 11) auf einer Skala von 1-6 selbstständig angekreuzt werden. Der PSQ diente der Erfassung der persönlich wahrgenommenen Lebensqualität. Es wurden 20 Items auf einer Skala von 1-4 selbstständig angekreuzt.

Tabelle 11: Unterkategorien des RQLQ

A (von 1-6)	1 Normale Tätigkeiten zu Hause und bei der Arbeit		Activity Limitation
	2 Freizeitaktivitäten		
	3 Schlaf		
B (von 1-6)	4 Nase oder Augen reiben müssen		Practical Problems
	5 Ständig Nase putzen müssen		
	6 Niesen		Nose Symptoms
	7 Verstopfte Nase		
	8 Laufende Nase		
	9 Juckende Augen		Eyes Symptoms
	10 Entzündete Augen		
	11 Tränende Augen		
	12 Müdigkeit und/oder Abgeschlagenheit		Other Symptoms
	13 Durst		
	14 Reizbarkeit		

## 3.5 Sputuminduktion

Zunächst wurden drei gleichartige Lungenfunktionsmessungen durchgeführt. Im Anschluss wurden 400µg Salbutamol in Form von vier Sprühstößen eines Dosieraerosols per inhalationem appliziert. Die Einwirkzeit betrug 20 Minuten. Nun erfolgte erneut eine dreimalige Lungenfunktionsmessung vor Beginn der Aerosolinhalation. Der FEV1-Wert wurde zur Überwachung der Bronchokonstriktion herangezogen. Dabei diene der höchste FEV1-Wert als Grundlage zur Berechnung des FEV1-Abfalls. Bei weniger als 10% FEV1-Abfall konnte die NaCl-Konzentration im nächsten Schritt gesteigert werden. Überstieg der FEV1-Abfall 10% wurde die Messung dreimal wiederholt. Bestätigte sich eine Messung mit einem FEV1-Abfall zwischen 10% und 20%, so wurde die vorangegangene NaCl-Konzentration erneut verwendet. Wurden 20% FEV1-Abfall überschritten, wurde die Induktion abgebrochen und 200µg Salbutamol notfallmäßig appliziert.



Abbildung 4: **Geräte zur Sputuminduktion** (Inhalator, Spirometer, Salbutamol-Spray und Nasenklemme)

Das erste Inhalationsintervall mit einer Dauer von 7 Minuten erfolgte mit 3%-iger NaCl-Lösung. Der Proband trug dabei eine Nasenklammer, saß aufrecht und atmete tief und gleichmäßig durch das Mundstück des PariBoy. Nach Abschluss des ersten Induktionsintervalls putzte er durch kräftiges Schnutzen seine Nase und spülte dreimal gründlich seinen Mund mit Trinkwasser, um eine Verunreinigung der Probe mit beispielsweise Plattenepithel oder Speiseresten im Mund- und Rachenraum zu verhindern. Danach erzeugte der Proband mit Hilfe eines Papiertaschentuchs einen Widerstand vor Mund und Nase, gegen welchen er das induzierte Sputum hochhustete und in ein abgewogenes Falcon-Röhrchen spuckte. Sprechen war nach der Mundspülung nicht erlaubt. Falls der Proband, trotz dieser Anweisung, sprach, wurde die Mundspülungsprozedur wiederholt (s.o.).

Nach beendeter Sputumabgabe wurde erneut die Lungenfunktion gemessen, um eine eventuelle Veränderung des FEV1 gegenüber der Post-Salbutamol-Lungenfunktion zu berechnen und bei einem FEV1-Abfall einzugreifen. Das

Vorgehen der klinischen Visite wurde in Abbildung 5 zusammengefasst.

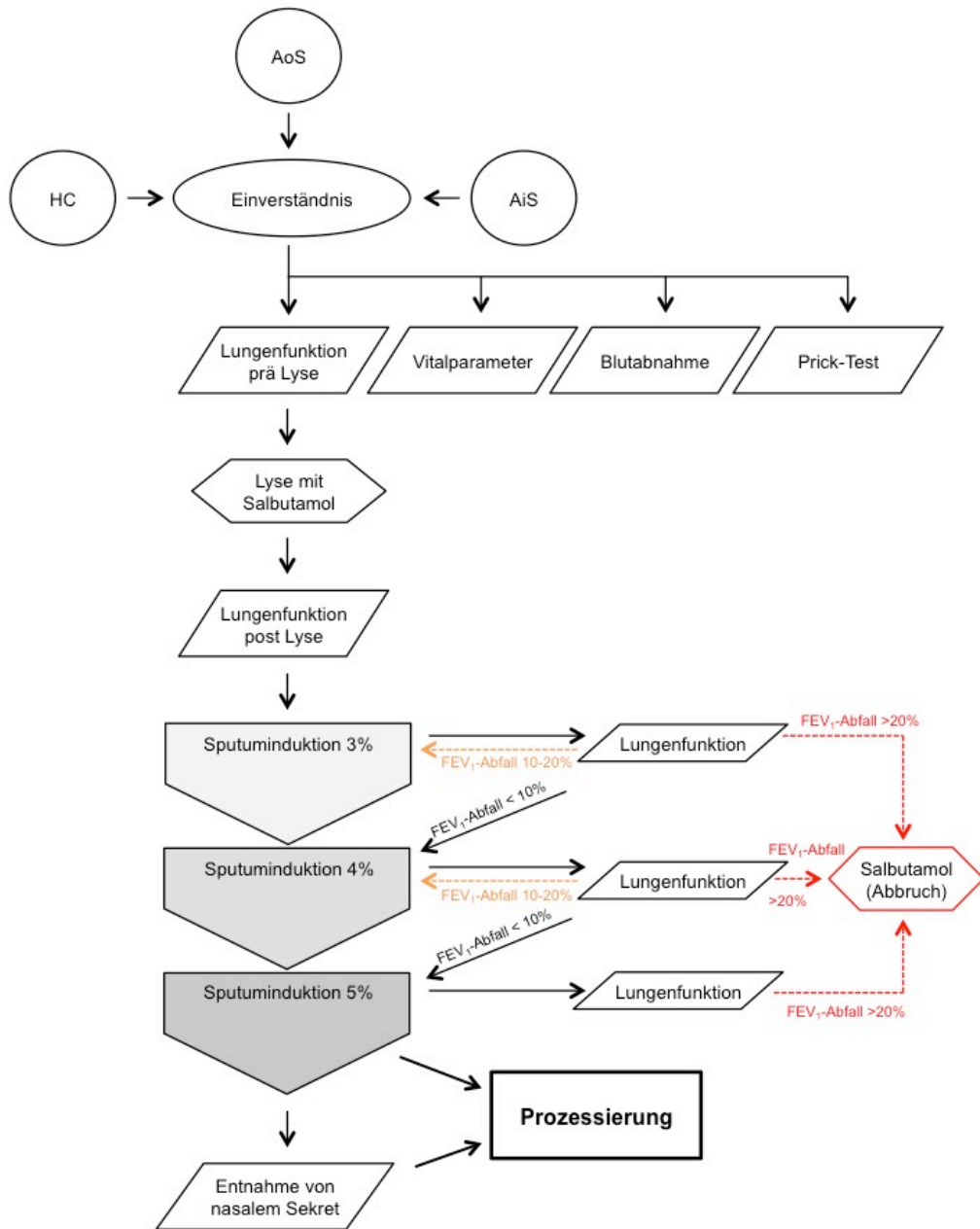


Abbildung 5: **Schematischer Prozessablauf einer klinischen Probandenvisite** bei allergischen Asthmatikern „in season“ (AiS), allergischen Asthmatikern „out of season“ (AoS) und gesunden Kontrollen (HC).

## 3.6 Prozessierung des Sputums

Die Probe wurde auf Eis aufbewahrt und transportiert, jedoch spätestens nach zwei Stunden wurde mit dem ersten Schritt der Sputumprozessierung begonnen. Eine Einhaltung dieses Zeitrahmens zur optimalen Zellzählung und Färbung wird empfohlen (Quirce et al., 2010).

Zuerst wurden Sputumplaques aus einer Petrischale selektiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt und das selektierte Sputumgewicht bestimmt.

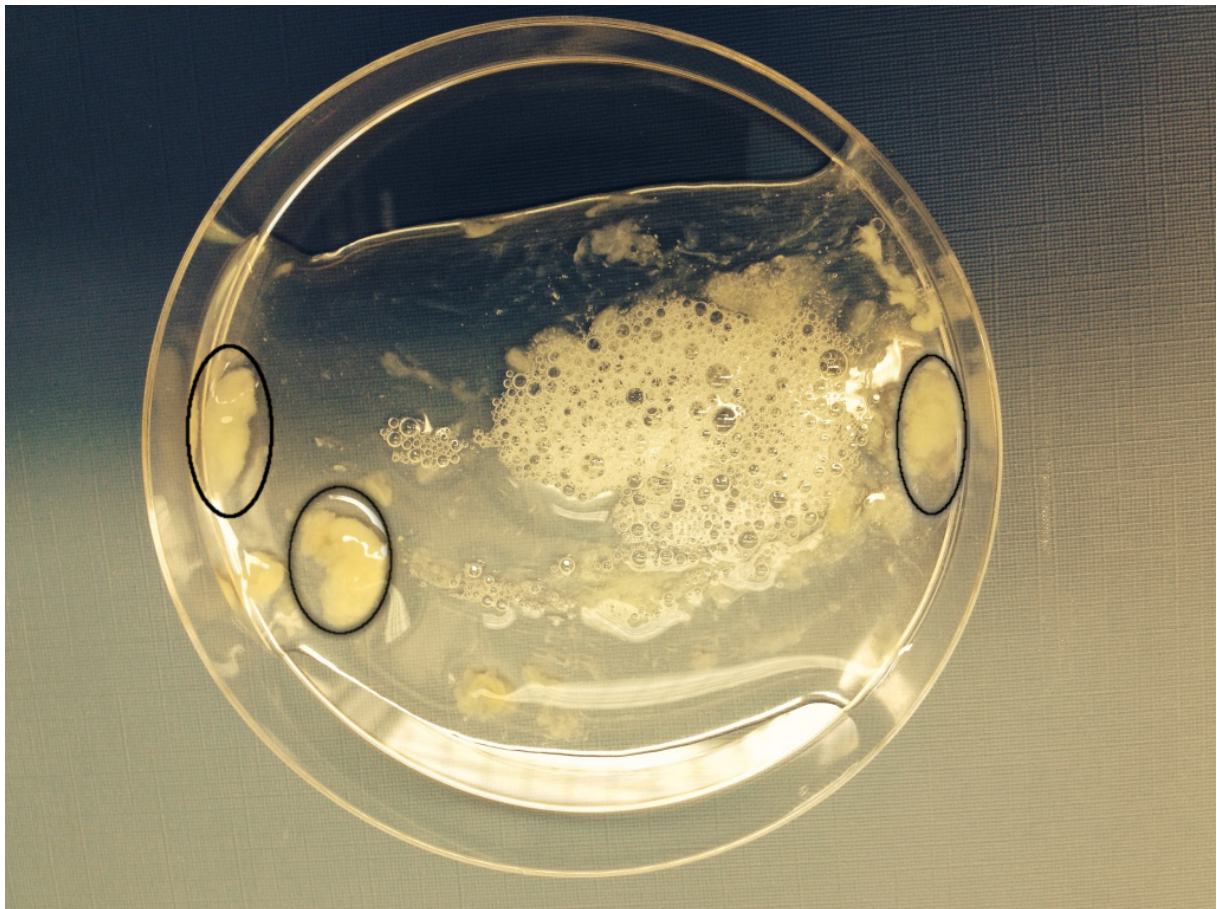


Abbildung 6: **Sputumplaques** (beispielhafte Markierung) innerhalb der Saliva in einer Petrischale.

Im nächsten Schritt wurde eine 1:10 Sputolysin-Arbeitslösung hergestellt und die Probe damit im Verhältnis (Gewicht-Sputolysin: Gewicht-Probe) 4:1 verdünnt. Anschließend folgten 15 Minuten Inkubation auf einem Schüttler bei 4°C im Kühlraum. Nach Ende der Inkubationszeit wurde PBS im Verhältnis PBS:Probe = 2:1 hinzugefügt, 15 Sekunden gevortext und durch einen 70µm Falcon-Filter filtriert. Anschließend wurden 10µl Zellsuspension zur Zellzählung entnommen und die restliche Probe 10 min. bei 2000 rpm, 4°C und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Fünf Überstände zu je 450µl wurden eingefroren und nach Resuspension wurden Proben für Zytospins und FACS entnommen. Die restlichen Zellen wurden in 1000µl Qiagen RNA CellProtect als Suspension bei -80°C eingefroren.

10µl der Zellsuspension wurden mit 10µl Trypanblau versetzt und vermischt. Anschließend wurden 10µl der entstandenen Mischung in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Im Auflichtmikroskop wurden alle 4 Quadranten auf lebende Leukozyten, tote Leukozyten und squamöse Zellen ausgezählt.

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der an intrazellulären Zellproteinen haftet. Er dringt in tote Zellen mit defekter Zellwand ein, färbt das Zytosol tiefblau und macht damit tote Zellen für den Untersucher sichtbar. Die Auszählung muss innerhalb von 5 Minuten stattfinden, da der zytotoxische Farbstoff nach zu langer Einwirkzeit selbst Zellen abtötet und damit in der Zählung der toten Zellen zu Messfehlern führt. Leukozyten wurden als runde, helle Zellen erkannt. Plattenepithel konnte aufgrund seines typischen mehreckigen Aussehens mit großem Zellkern differenziert werden. Es wurden alle 4 Quadranten ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Außerdem wurde mit Hilfe der Zellkonzentration und dem Suspensionsvolumen eine abschätzende Gesamtzellzahl, der Anteil toter Leukozyten und der Anteil an Plattenepithelzellen berechnet.

Die Auszählung diente der weiteren der Bestimmung des Auffüllvolumens um eine Konzentration von 500.000 Zellen pro ml zu erreichen. Mit dieser Zellsuspension definierter Konzentration konnten Zytospin-Präparate mit kontrollierbarer Zelldichte hergestellt werden.

## 3.7 Zytospin-Technik

Pro Proband wurden vier Zytospin-Präparate angefertigt. Dazu wurden vier Objektträger mit Filterpapier in die „Cytoclip“-Befestigung eingespannt. Anschließend wurden zwei Proben mit 100µl und zwei Proben mit 75µl der Lösung (500.000 Zellen/ml) in den integrierten Trichter gefüllt und bei 450 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Dann wurden die Objektträger unter dem Auflichtmikroskop auf die Zelldichte überprüft. Bei zu geringer Zellkonzentration auf dem Objektträger, kann die Minimalanzahl von 400 Zellen pro Probe nicht ausgezählt werden. Ist die



Zellkonzentration zu hoch, gelingt durch Überlappungsphänomene keine valide Differenzierung der Zellen. In diesem Fall müsste die Zellzahl bzw. das Volumen in einem neuen Objektträger angepasst werden. Nach mindestens 30 Minuten Trocknungszeit wurden die Zellen für 5 Minuten in reinem Methanol fixiert und die Objektträger anschließend erneut getrocknet. Die Lagerung erfolgte zu jeder Zeit lichtgeschützt.

Alle Zytopsin-Präparate wurden nach dem Protokoll von Eckrich & Zissler (Eckrich et al., 2016) nach Pappenheim gefärbt. Dazu wurden sie zuerst 3 Minuten in May-Grünwald-Lösung getaucht und mehrfach mit Wasser gespült. Anschließend folgten 35 Minuten Färbung in 20%-iger Giemsa-Lösung. Die Objektträger wurden dann erneut mit Wasser gespült und anschließend an der Luft getrocknet. Die trockenen Objektträger wurden für 10 Sekunden in Xylol gelegt. Danach wurde ein Deckgläschen mit 3 Tropfen Eukitt aufgeklebt.

Die Zelldifferenzierung erfolgte manuell mit Hilfe eines Auflichtmikroskops. Es wurden pro Präparat 400 Zellen unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung im Immersionsölobjektiv ausgezählt. Die Auszählung erfolgte jeweils von zwei unabhängigen Auszählern nach einem festen Schema. Es wurde der Mittelwert der beiden Zähler für die prozentuale Zellzahl veranschlagt. Dabei wurden die Proben, wie in Abbildung 7 dargestellt, mit einem wasserfesten Stift in 4 gleiche Abschnitte geteilt und pro Quadrant mäanderförmig, vom Zentrum ausgehend jeweils 100 Zellen ausgezählt.

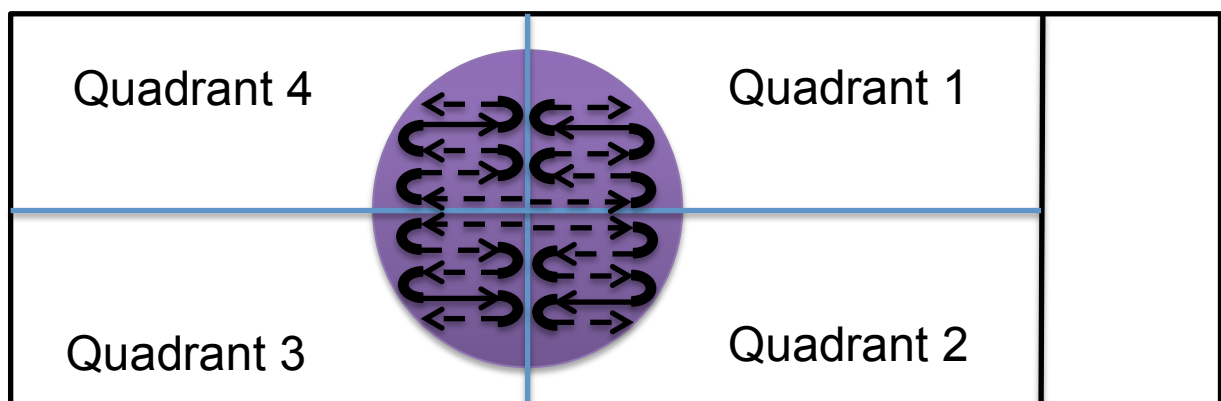


Abbildung 7: **Auszählungsschema eines Objektträgers** mit definierter Vorgehensweise zur Auszählung von 100 Zellen pro Quadrant.

Indem jeder Zähler in etwa den gleichen Bereich auszählte, konnten individuelle Zählfehler besser erkannt und analysiert werden. Die Technik wurde verwendet um

die Inter-Zähler-Abweichung zu minimieren und eventuelle diagnostische bzw. qualitative Abweichungen gut zu erkennen. Differenziert wurden Alveolarmakrophagen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellpopulation an den Gesamtleukozyten wurde den statistischen Berechnungen zugrunde gelegt.

### 3.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine geeignete Methode, um die Antigen-Eigenschaften einer großen Anzahl von Zellen zu bestimmen. Dabei werden die Zellen vereinzelt in einem Flüssigkeitsstrom von vier Lasern mit verschiedenen Wellenlängen (blau, rot, gelb-grün und violett) beschossen. Anhand der Größe im Vorwärtsstreulicht, Granularität im Seitwärtsstreulicht und unter Ausnutzung fluoreszenzmarkierter Antikörper können extrazelluläre und intrazelluläre Antigene qualitativ und quantitativ gemessen werden um die Zelle zu charakterisieren. Jede Zelle passiert dabei einzeln eine Messzelle. Das aufgefangene Licht der fluoreszierenden Antikörper wird über Sammellinsen und Filter zu Detektoren geleitet. Diese zeichnen die auftreffenden Photonen abhängig von der voreingestellten Spannung als elektrisches Signal auf. Wichtig ist eine präexperimentelle Abstimmung der Absorptions- und Emissionsspektren aller verwendeter Farbstoffe um möglichst wenig Nachkompensation wegen Einstrahlung eines Farbstoffes in die benachbarten Kanäle bzw. Lichtfrequenzen zu benötigen. Aufgrund der, trotz präziser Farbwahl, ubiquitär vorhandenen Fremdstrahlung in den meisten Kanälen wurde eine Kompensationsmatrix erstellt.

Auf dieser Grundlage konnte anschließend eine Gating-Strategie erstellt werden, mit deren Hilfe die einzelnen Zellpopulationen anhand ihrer gemessenen Eigenschaften dargestellt wurden. Verwendet wurden spezifische Antikörper für die in Tabelle 12 dargestellten Oberflächenantigene.

Tabelle 12: Antikörper mit Zielantigen, Farbstoff und eingesetzter Verdünnung

CD 3	CD 4	CD 8	CD 19	CD 25	CD 45	CD 56	CD 69	CD 127	CD 294
V500	V450	Pe-Cy7	Alexa Fluor 700	FITC	APH-7	Brilliant Violet 605	PE	Brilliant Violet 711	APC
1:100	1:100	1:100	1:100	1:20	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100

Die Lebend-Tot-Färbung erfolgte mit Hilfe von 7-AAD in 5µl:100µl (7-AAD:FACS-Puffer) mit zuvor 1:3-verdünntem 7-AAD-PercP.

Als Messgerät wurde das FACS LSR II Fortessa mit 4 Lasern [violett (405nm), blau (488nm), gelb-grün (561nm) und rot (640nm)] verwendet, welches die Messung von bis zu 16 Parametern gleichzeitig ermöglicht. Die Detektion von FITC erfolgte über einen 515/20 Bandpass-Filter mittels des 488 nm Laser, APC unter Verwendung des 670/14 Filters mit dem 640 nm Laser, PE mittels 575/26 und 532 nm Laser, und DAPI mit einem 450/50 Filter mit 355 nm Laser. Es wurden jeweils mindestens 50000 Zellen der Proben mit allen Antikörpern (all) und ohne Farbstoff (unstained) im FACS Fortessa eingelesen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mittels FacsDiva (8.0)-Software, die Auswertung der Daten mittels FlowJo (Version 10.0.8).

In der Gating-Strategie wurden zunächst alle Dupletten ausgeschlossen, indem Datenpunkte, deren FSC-A (Forward Scatter - Area under the curve) und FSC-H (Forward Scatter - Height of the peak) nicht stark übereinstimmen und damit nicht auf der Diagonale des Dotplots lagen, entfernt. Somit konnten Zellen ausgeschlossen werden, die aneinander anhafteten und nicht einzeln und valide auf ihre individuellen Eigenschaften gemessen werden konnten. Die Zellen wurden danach mit Hilfe von Vorwärts-Scatter und Seitwärts-Scatter auf die vorbekannte, genau lokalisierte Leukozytenpopulation gated. Dann wurden die toten Zellen (7-AAD positiv) ausgegated.

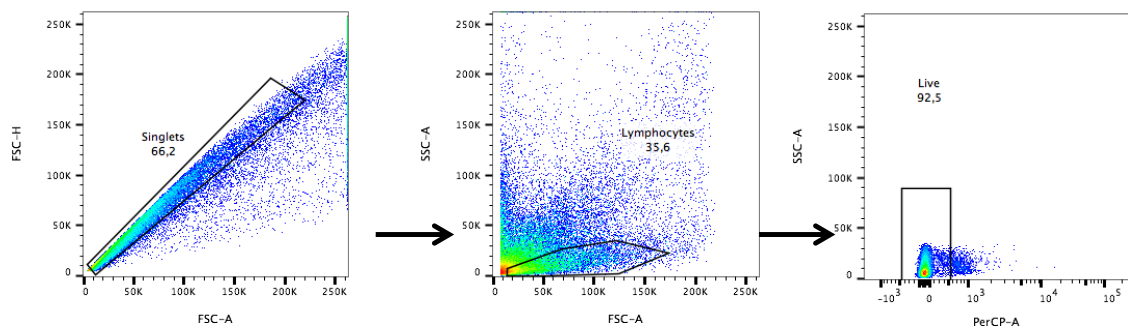


Abbildung 8: **Gating-Schema auf einzelne Zellen, Lymphozyten und lebenden Zellen** (von links nach rechts).

Anschließend wurden aus der Population der vereinzelteten, lebenden Lymphozyten heraus die spezifischen Populationen bestimmt. Die CD19 positive Population wurde als B-Zelle identifiziert. T-Zellen wurden mittels  $CD3^+$  erkannt. Die T-Helferzellen als  $CD3^+/4^+$ , die zytotoxischen T-Zellen mittels  $CD3^+/8^+$ . Dabei galt besonderes Augenmerk den aktivierten T-Zellen mit  $CD3^+/4^+/25^+$  und  $CD3^+/4^+/69^+$ . Ein intrazelluläres FOXP3-Staining erfolgte nicht, die T-regulatorischen Zellen befinden sich aber in der Population  $CD25^+/127^-$  in  $CD3^+/4^+$ . Zudem wurden die TH2-Zellen mit Hilfe von  $CD3^+/4^+/CD294^+$  bzw.  $CD3^+/4^+/CRTH2$  gefärbt. NKT-Zellen wurden als  $CD3^+/56^+$ , NK-Zellen wurden als  $CD3^-/56^+$  identifiziert. B-Zellen ließen sich mittels der Oberflächeneigenschaft  $CD19^+$  darstellen.

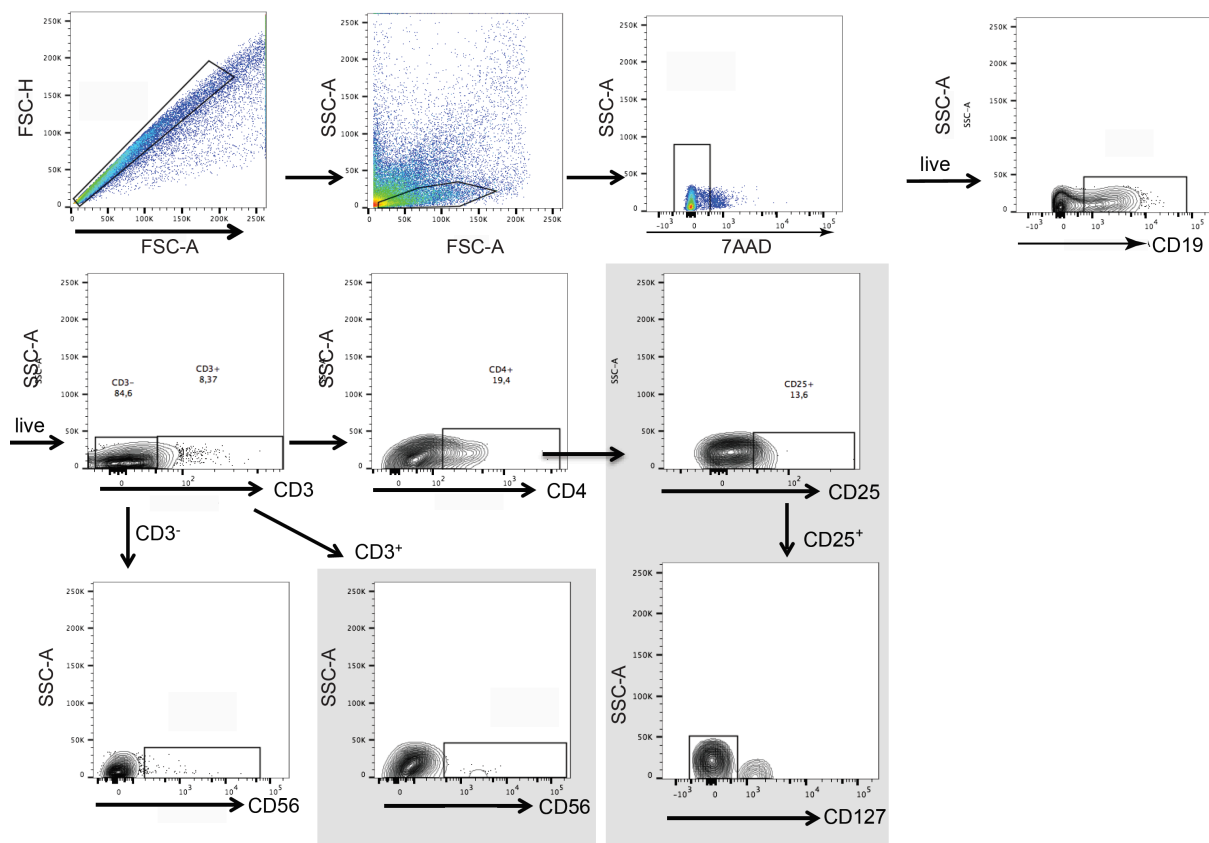


Abbildung 9: **Gating-Schema für einzelne Subpopulationen in der Durchflusszytometrie** (T-Zell-Subpopulationen grau markiert)

### 3.9 Elektrochemilumineszenz

Der Elektrochemilumineszenz-Assays ist eine hochsensitive und genaue Messmethode zur Bestimmung von Proteinen (Forster, Bertencello, & Keyes, 2009). Dabei werden Antikörper gegen das Zielantigen mit Ruthenium markiert. Bei Anlegen einer Spannung unter Anwesenheit von TPA kann es nun zur Chemilumineszenz, also der Lichtemission ohne Entstehung von Wärme, kommen, die von einer Messeinheit aufgefangen und detektiert wird. Ziel der Messung auf Proteinebene war der Nachweis von Cytokinen zur Charakterisierung des Proteoms im Sputum und im nasalen Sekret bei allergischen Asthmatikern. Die MSD Multi-Array-technologie kombiniert dabei hohe Sensitivität mit einem einfachen und schnellen Verfahren, da es ein plattenbasiertes Verfahren ist und mehrere Proteine simultan gemessen werden können. (Pavkovic, Riefke, Gutberlet, Raschke, & Ellinger-Ziegelbauer, 2014).

Es wurde, wie bereits veröffentlicht, das Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet (U. M. Zissler, Chaker, et al., 2016). 50µl der vorher nach SOP verdünnten Probe wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontal-Vertikal-Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Nach Inkubation wurde die Platte dreimal mit je 150µl Waschpuffer (PBS + 0,04% Tween) gewaschen und auf einem Zellstofftuch kräftig ausgeklopft. Je well werden 25µl Antikörperlösung hinzupipettiert. Anschließend wurde erneut für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontal-Vertikal-Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit je 150µl des oben genannten Waschpuffers gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe von 150µl des Read Buffers, wurde für 5 Minuten ausgelesen.

Es wurden MSD Mesoscale 10-Plex sowie ein MSD Mesoscale 6-Plex mit folgendem Panel gemessen:

Tabelle 13: Mesoscale Panel

<b>10-Plex:</b>	Eotaxin-3	IFN-g	IL-10	IL-13	IL-17	IL-1a	IL-4	IL-5	IL-8	TNF-a
<b>6-Plex:</b>	G-CSF	IL-22	IL-24	IL-33	Periostin	TSLP				

### 3.10 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 6.0 für Mac). Zur vergleichenden Auswertung wurden t-Tests nach Mann-Whitney (nicht normalverteilt, unverbunden) und Wilcoxon (nicht normalverteilt, verbunden) durchgeführt. Durch Normalverteilungsplots wurden normalverteilte Daten identifiziert und mit dem t-Test (mit/ohne Welch-Korrektur) getestet. Lineare Zusammenhänge wurden mit Hilfe von Korrelations-Tests nach Spearman durchgeführt. Die statistischen Tests erfolgten unter einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Die Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, mittels Mittelwert (Mean) und Standardfehler (Standard error of the mean) dargestellt. Zur Validierung eines Messinstruments wurden ROC-Analysen verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Messungen und Umweltdaten

#### 4.1.1 Anamnestische Daten und Allergiediagnostik

In diese Studie wurden Patienten mit saisonalem, allergischem Asthma (n=14) und gesunde Kontrollprobanden (n=14) eingeschlossen.

Tabelle 14: Probandencharakteristika von Kontrollen und Asthmatikern

Probandencharakteristika	Kontrollprobanden (n=14)	Saisonale Asthmatischer (n=14)	p-Wert
Alter	35,5 ± 3,2	38,5 ± 3,5	n.s.
Frauen/Männer	7 / 7	4 / 10	-
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	23,72 ± 0,78	25,74 ± 0,94	n.s.
SIT-Therapie	-	5	-
GINA-Score	-	1,64 ± 0,36	-
Gesamt-IgE [kU/l]	56,46 ± 16,05	438,02 ± 114,91	< 0,0001
Sx1 [kUA/l]	2,09 ± 1,05	37,68 ± 9,04	< 0,0001
Prick-Test Birke [mm]	0,36 ± 0,29	6,07 ± 0,94	< 0,0001
Prick-Test Gräser [mm]	0,29 ± 0,19	6,00 ± 1,01	< 0,0001
Asthma (%)	0%	100%	-
Sensibilisierung (%)			
Gräser	0%	92%	-
Birke	0%	83%	-
Hausstaub	14%	50%	-
Allergisches Asthma (%)	0%	100%	-

Die Probanden wurden mit Bedacht gewählt um möglichst viele Verzerrungseffekte auszuschließen. Das Alter betrug im Mittel 35,5 ± 3,2 Jahre bei den Kontrollen und 38,5 ± 3,5 Jahre bei den Asthmatikern und unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Das Geschlechterverhältnis war mit 7 Frauen zu 7 Männern in der Kontrollgruppe ausgeglichen, in der Asthmatischergruppe mit 4 Frauen zu 10 Männern eher zugunsten Letzterer. Die BMI-Werte unterschieden sich mit 23,72 ± 0,78 kg/m<sup>2</sup> bei den Kontrollen nicht signifikant von den Asthmatikern mit 25,74 ± 0,94 kg/m<sup>2</sup>. Unter den Asthmatikern befanden sich 5 Patienten in einer Immuntherapie oder im Zustand post Immuntherapie. Das Asthma war in 4 Patienten

unkontrolliert, im Mittelwert war der Asthmakontrollgrad nach GINA-Score bei  $1,64 \pm 0,34$  Score-Punkten. Die IgE- und Sx1-Werte waren hochsignifikant unterschiedlich (IgE: HC vs. Asthma  $p < 0,0001$ ; Sx1: HC vs. Asthma  $p < 0,0001$ ). Die Quaddeldurchmesser nach Pricktest mit Gräser-, und Birkenallergen unterschieden sich in beiden Gruppen ebenfalls signifikant (Gräser: HC vs. Asthma  $p < 0,0001$ ; Birke: HC vs. Asthma  $p < 0,0001$ ).

## 4.1.2 Lungenfunktionsmessungen

Die Lungenfunktionsmessungen erfolgten bei jedem Probanden vor (prä-) und nach (post-) Lyse mit einem Handspirometer bei verschlossener Nase. Tabelle 15 zeigt die Lungenfunktionswerte von Kontrollen und Asthmatikern.

Tabelle 15: Lungenfunktionswerte bei Asthmatikern

Lungenfunktion	Asthmatiker "out of season" (n=12)	Asthmatiker "in season" (n=14)
FVC Mittelwerte (prä/post) [L]	$4,66 \pm 0,42$	$4,75 \pm 0,39$
FEV <sub>1</sub> [L] prä-Lyse	$3,74 \pm 0,38$	$3,86 \pm 0,31$
FEV <sub>1</sub> [L] post-Lyse	$4,14 \pm 0,44$	$4,13 \pm 0,42$
FEV <sub>1,max.</sub> [L] prä-Lyse	$3,81 \pm 0,36$	$3,82 \pm 0,32$
FEV <sub>1,max.</sub> [L] post-Lyse	$4,21 \pm 0,42$	$4,25 \pm 0,45$
Tiffeneau-Index prä-Lyse [%]	$83,00 \pm 2,74$	$83,93 \pm 2,26$
Tiffeneau-Index post-Lyse [%]	$85,50 \pm 2,63$	$84,21 \pm 2,05$

Es wurden die forcierte Vitalkapazität (FVC), die maximale Einsekunden-Kapazität (FEV<sub>1</sub>) von 3 Messungen jeweils vor und nach Lyse und der Tiffeneau-Index (FEV<sub>1</sub>/FVC= Tiffeneau-Index) jeweils vor und nach Lyse gemessen. Die einzelnen Probandengruppen unterschieden sich dabei in keiner Messung signifikant voneinander. Die weiteren Lungenfunktionsmessungen nach Sputuminduktion wurden aus Sicherheitsgründen durchgeführt und sind im Rahmen dieser Studie nicht relevant.



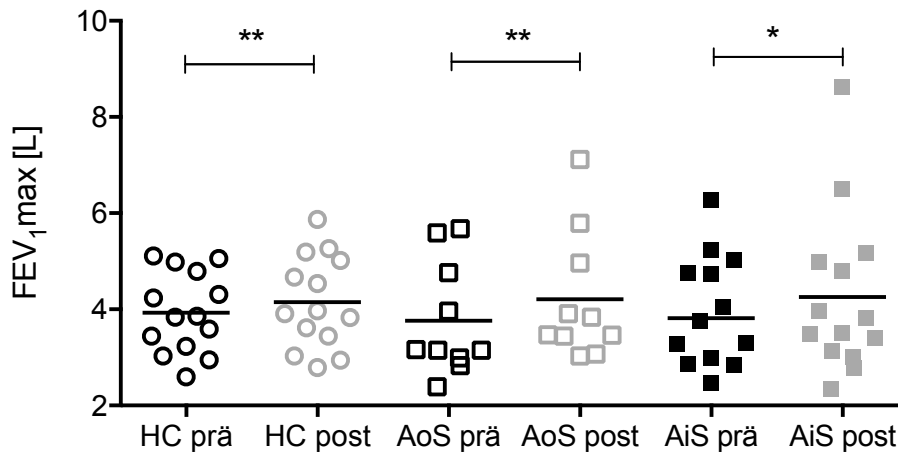


Abbildung 10: **Lungenfunktionsdaten** von Kontrollen (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ jeweils vor Salbutamol-Lyase (prä) und nach Salbutamol-Lyase (post). Signifikante Verbesserung innerhalb jeder Gruppe nach der Salbutamol-Lyase. Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Für den gepaarten Test zwischen prä- und post-Lyase wurde der Wilcoxon-Test verwendet.

Nur die ermittelten maximalen FEV<sub>1</sub>-Werte vor und nach Salbutamol-Lyase waren bei gepaarter Testung innerhalb der jeweiligen Probandengruppe post-Lyase im Vergleich zu prä-Lyase signifikant erhöht. (HC prä vs. HC post p=0,0012; AoS prä vs. AoS post p= 0,0039; AiS prä vs. AiS post p= 0,0134).

## 4.1.3 Lebensqualität und subjektives Stresserlebnis bei Asthma bronchiale

### 4.1.3.1 RQLQ

Bei allergischem Asthma spielt neben der Atopie auch die Quantität und Qualität der Symptome und der Einfluss auf die Lebensqualität eine große Rolle. Die Lebensqualitätseinbußen durch Symptome an Augen und Nase wurde mit dem standardisierten RQLQ-Fragebogen abgefragt. Ein hoher Wert geht mit einer hohen Beeinträchtigung der Lebensqualität im Alltag einher. Die Fragen konnten zusätzlich den Kategorien „Aktivitätseinschränkungen“, „Praktische Probleme“, „Augen-Probleme“, „Nasale Probleme“ und „Andere Probleme“ zugeordnet werden.

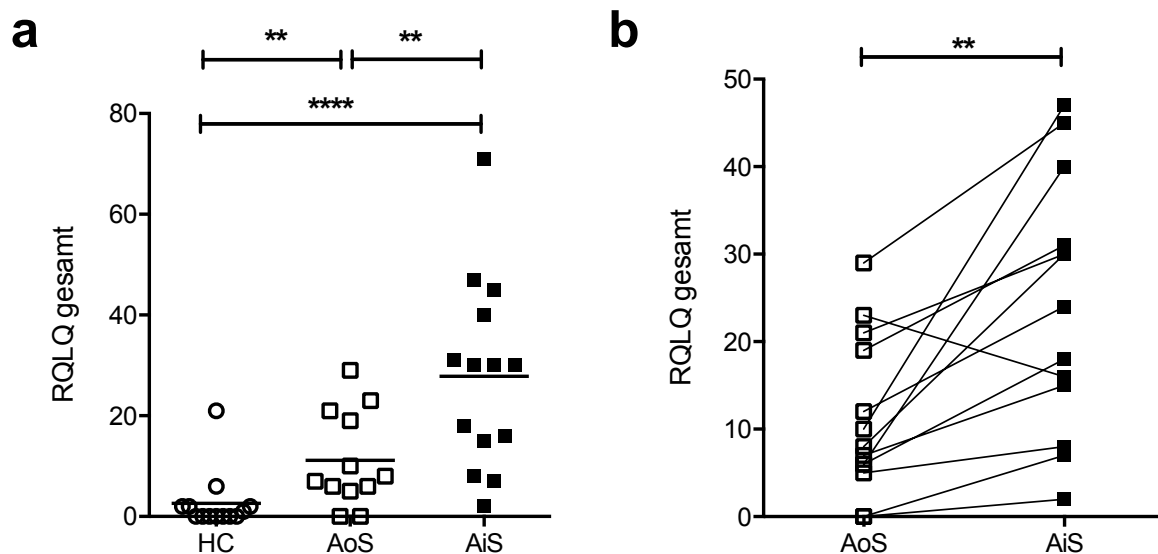


Abbildung 11: **RQLQ-Gesamtsumme** a) von Kontrollen (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS). Alle Probandengruppen unterscheiden sich signifikant voneinander. Dabei haben die Asthmater „in season“ die höchste Beeinträchtigung der Lebensqualität. Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. b) RQLQ-Gesamtsumme von Asthmatikern „out of season“ und „in season“ mit Verbindungslinien. Die Beeinträchtigung der Lebensqualität steigt bei Asthmatikern signifikant zur Pollensaison an. Die Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test.

Die Kontrollgruppe hatte demnach die höchste Lebensqualität, gefolgt von den Asthmatikern out of season. Die Asthmater in season hatten die subjektiv höchste Beeinträchtigung und damit die geringste Lebensqualität (HC:  $3,21 \pm 1,60$  AoS:  $11,17 \pm 2,73$  und AiS:  $27,86 \pm 5,02$ ). Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Probandengruppen (HC vs. AoS  $p= 0,0046$ , HC vs. AiS  $p< 0,0001$ , AoS vs. AiS  $p= 0,0087$ ). Auch bei gepaarter Testung wurde ein signifikanter Anstieg von Asthmatikern in zu außerhalb der Saison gemessen und graphisch dargestellt (AoS vs. AiS  $p=0,0029$ ).

#### 4.1.3.2 PSQ

Eine Krankheit bedeutet auch auf psychologischer Ebene Stress. Um den aktuell vom Probanden wahrgenommenen psychischen Stress zu messen eignet sich der PSQ, der „Perceived Stress Questionnaire“ (Fliege et al., 2005). Die einzelnen Frage konnten zusätzlich den Unterkategorien „Anspannung“, „Freude“, „Beanspruchung“ und „Sorgen“ zugeordnet werden.

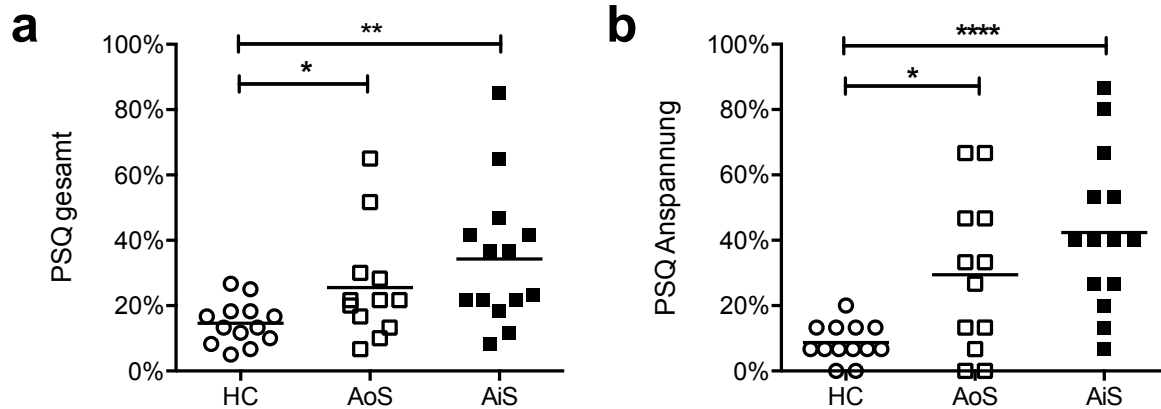


Abbildung 12: **PSQ-Wert** von Kontrollen (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS). Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. (a) PSQ- Gesamtwert im Vergleich. Die Kontrollgruppe hat insgesamt signifikant weniger Stress als die Asthmatiker in season. (b) PSQ-Wert in der Unterkategorie „Anspannung“ im Vergleich. Die Kontrollgruppe ist im Vergleich zu Asthmatikern „in season“ und „out of season“ signifikant weniger angespannt.

Die Kontrollgruppe hatte im Mittel die kleinste Gesamtbelastung, die Asthmatiker „out of season“ eine höhere Gesamtbelastung und Asthmatiker „in season“ die höchste Gesamtbelastung (HC:  $15,12 \pm 1,76\%$  AoS:  $25,56 \pm 4,90\%$  AiS:  $34,29 \pm 5,66\%$ ). Dabei war jeweils der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Asthmatikern signifikant (HC vs. AoS  $p= 0,0435$ ; HC vs. AiS  $p= 0,0021$ ).

In der Unterkategorie „Anspannung“ wurden bei Asthmatikern „in season“ und „out of season“ im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils höhere Werte gemessen (HC:  $9,05 \pm 1,50\%$  AoS:  $29,44 \pm 6,84\%$  AiS:  $42,38 \pm 6,35\%$ ) und die Unterschiede waren jeweils signifikant (HC vs. AiS  $p < 0,0001$ ; HC vs. AoS  $p= 0,0163$ ).

In der Unterkategorie „Freude“ zeigte sich im Vergleich zwischen Kontrollen und Asthmatikern in saison (HC:  $86,19 \pm 3,00\%$  AoS:  $76,67 \pm 6,00\%$  AiS:  $65,71 \pm 6,17\%$ ) ein verminderte Freude bei den Asthmatikern mit signifikantem Unterschied. Auch bei der Unterkategorie „Beanspruchung“ unterschieden sich diese beiden Gruppen signifikant (HC:  $22,86 \pm 3,68\%$  AoS:  $33,33 \pm 6,46\%$  AiS:  $38,57 \pm 6,34\%$ ; HC vs. AiS  $p= 0,0323$ ). In der Unterkategorie „Sorgen“ bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probandengruppen.

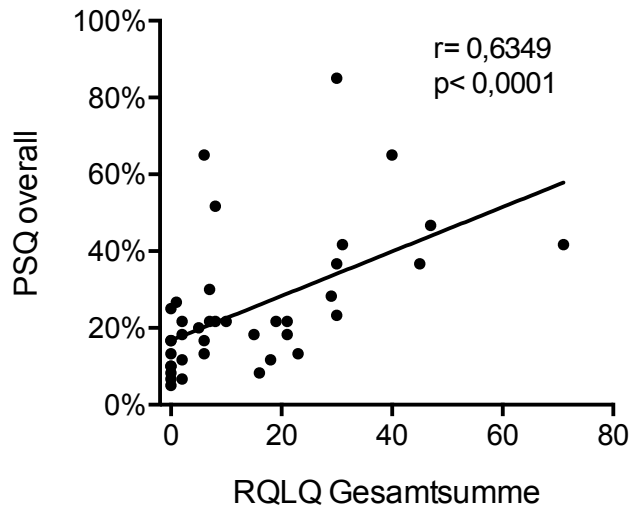


Abbildung 13: Die RQLQ-Gesamtsumme korreliert mit dem PSQ-Wert. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation ( $r = 0,6349$   $p < 0,0001$ ) zwischen psychischem Stress (PSQ overall) und Beeinträchtigung der Lebensqualität (RQLQ Gesamtsumme).

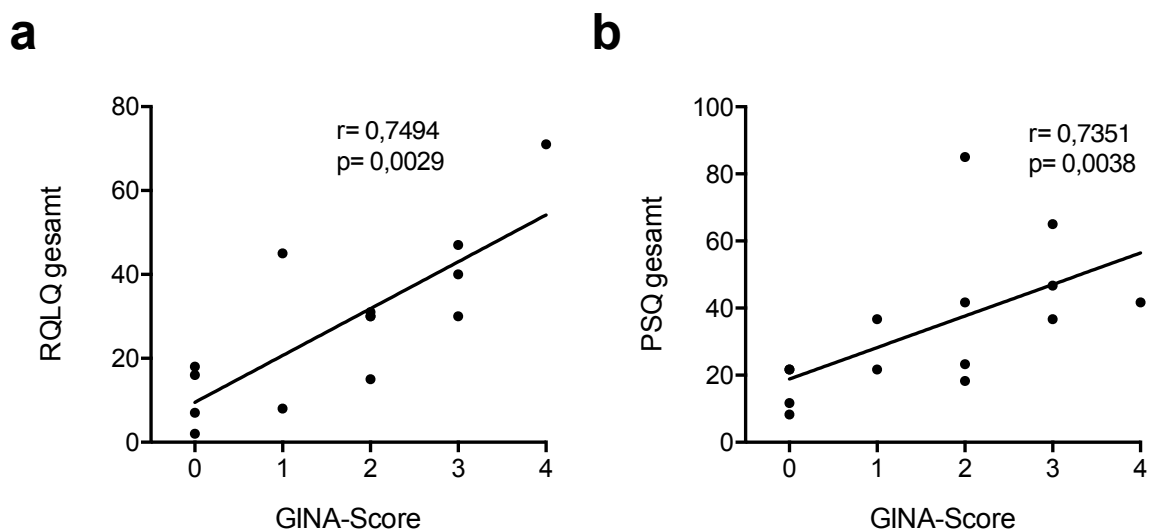


Abbildung 14: Fragebogenergebnisse des (a) RQLQ und (b) PSQ korrelieren mit dem GINA-Score. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Sowohl der RQLQ ( $r = 0,7494$   $p = 0,0029$ ) als auch der PSQ ( $r = 0,7351$   $p = 0,0038$ ) korrelieren signifikant mit dem Asthmakontrollgrad, dem GINA-Score. Je unkontrollierter das Asthma, desto höher ist zum einen das Stresslevel und umso niedriger ist die Lebensqualität.

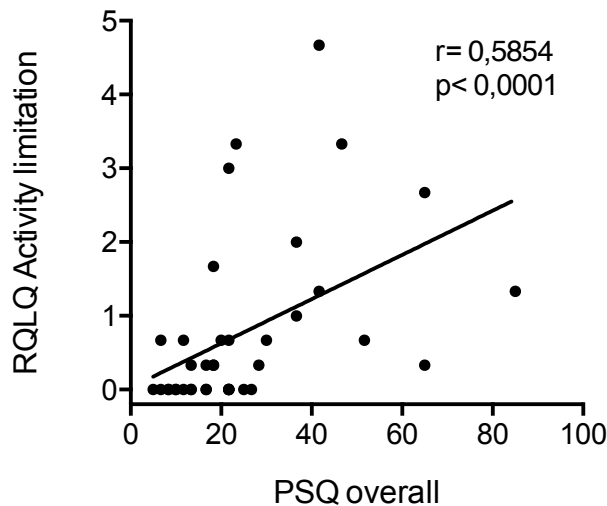


Abbildung 15: **Die PSQ-Gesamtsumme korreliert am stärksten mit der PSQ-Untergruppe Aktivitätseinschränkung.** Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Von allen RQLQ-Subkategorien (Aktivitätseinschränkungen, Praktische Probleme, Augen-Symptome, Nasen-Symptome, andere Symptome) bestand die höchstgradigste Korrelation zwischen Lebensqualitäts-Einbußen durch Aktivitätseinschränkungen und psychischer Gesamtbelastung ( $r = 0,5854$   $p < 0,0001$ ). Die Kategorien „Praktische Probleme“ ( $r = 0,5453$   $p = 0,0003$ ), Augen-Symptome ( $r = 0,5339$   $p = 0,0005$ ), Nasen-Symptome ( $r = 0,5338$   $p = 0,0005$ ) und andere Symptome ( $r = 0,755$   $p = 0,0001$ ) korrelierten geringgradiger.

## 4.2 Zelluläre Diagnostik

### 4.2.1 Leukozytenzählung

Bei der Sputumprozessierung wurden die Leukozyten mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei wurde die Leukozytenkonzentration im (selektierten) Sputum bestimmt, die sogenannte „Leukozytenzählung“.

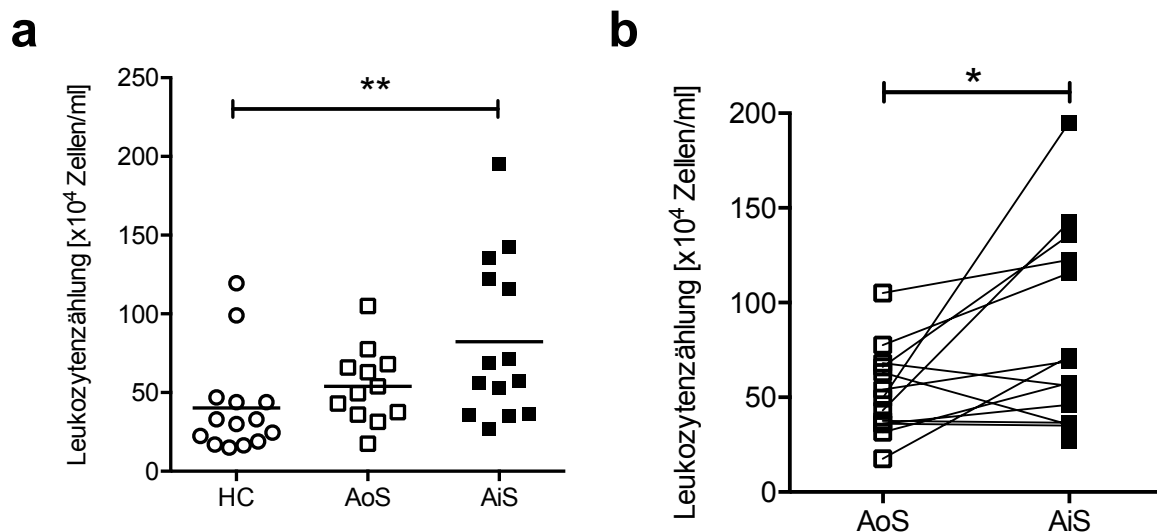


Abbildung 16: **Leukozytenzählung** (a) Vergleich bei Kontrollen (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS). Asthmatiker haben im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils eine signifikant höhere Konzentration an Leukozyten im Sputum. Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. (b) Gepaarter Vergleich der Leukozytenzählung bei Asthmatikern „out of season“ (AoS) und „in season“ (AiS). Die Konzentration an Leukozyten im Sputum ist bei Asthmatikern im gepaarten Test „in season“ höher als „out of season“. Die Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test.

Die Leukozytenzählung war bei Asthmatikern „in season“ im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (HC:  $38,50 \pm 8,00 \times 10^4$  Leukozyten/ml AoS:  $52,65 \pm 6,43 \times 10^4$  Leukozyten/ml AiS:  $79,87 \pm 12,94 \times 10^4$  Leukozyten/ml; HC vs. AiS  $p= 0,0024$ ). Im Vergleich von Asthmatikern „out of season“ zu Asthmatikern „in season“ zeigte sich in der ungepaarten Testung eine Tendenz, in der gepaarten Testung zeigte sich ein signifikanter individueller Anstieg der Leukozytenkonzentration „in season“ (AoS vs. AiS  $p= 0,0313$ ).

## 4.2.2 Zelldifferenzierung

Nach der Sputumprozessierung wurden zur Differenzierung und Quantifizierung der vorkommenden Leukozytensubtypen im Sputum Zytopspin-Präparate angefertigt, mit der Methode nach Pappenheim gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dies ist eine Standardmethode zur Validierung des induzierten Sputums und bietet einen guten Überblick über die verschiedenen Zellreihen.

Tabelle 16: Zelllast und Zelldifferenzierung von Kontrollen und Asthmatikern

	Kontrollprobanden	Asthmatiker "out of season"	Asthmatiker "in season"
Gesamtzellzahlx10 <sup>4</sup> /mL			
Mittelwert	40,29	54,04	82,29**
SEM	8,38	6,56	13,65
Makrophagen, %			
Mittelwert	92,50	81**	75,43**
SEM	1,50	3,09	4,47
Neutrophile Granulozyten, %			
Mittelwert	6,55	10,92	19,39**
SEM	1,44	2,42	4,42
Eosinophile Granulozyten, %			
Mittelwert	0,41	3,35*	3,95***
SEM	0,15	0,90	0,99
Basophile Granulozyten, %			
Mittelwert	0,04	1,85**	0,41**
SEM	0,04	0,58	0,16
Lymphozyten, %			
Mittelwert	0,50	0,79	0,84
SEM	0,16	0,29	0,19

Signifikanz im Vergleich zu Kontrollprobanden - \*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,001

Die wichtigsten Granulozytensubpopulationen wurden in Abbildung 17 detailliert dargestellt und verglichen.

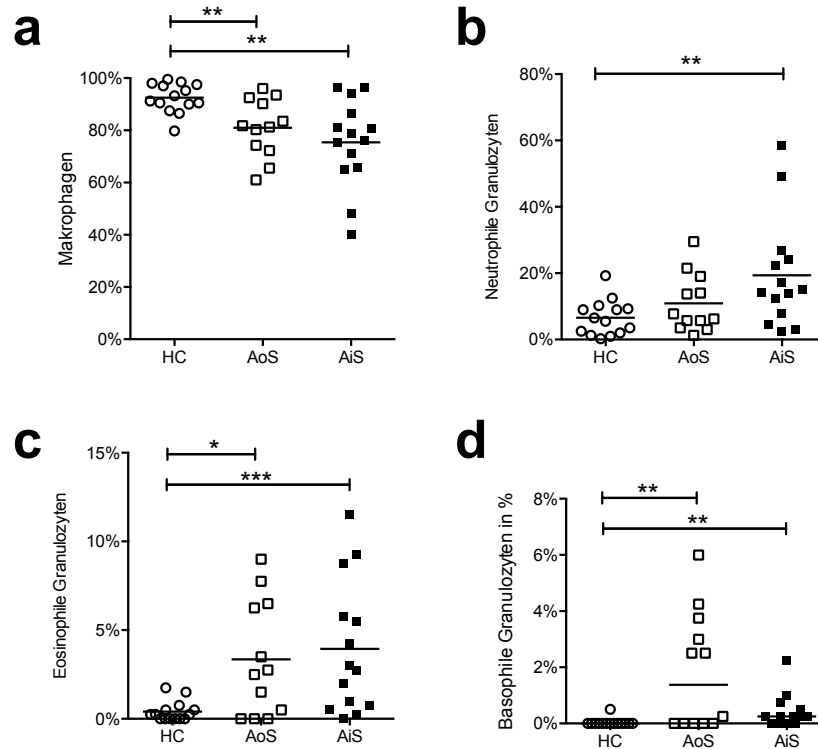


Abbildung 17: **Prozentualer Anteil der Leukozytenpopulationen** bei Kontrollen (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS) im Vergleich. Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. (a) Makrophagen: Signifikant weniger Makrophagen im Sputum von Asthmatikern im Vergleich zur Kontrollgruppe. (b) Neutrophile Granulozyten: Erhöhter Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten im Sputum von Asthmatikern „in season“ im Vergleich zur Kontrollgruppe. (c) Eosinophile Granulozyten: Signifikant mehr eosinophile Granulozyten im Sputum von Asthmatikern im Vergleich zur Kontrollgruppe. (d) Basophile Granulozyten: Signifikant mehr eosinophile Granulozyten im Sputum von Asthmatikern im Vergleich zu Kontrollgruppe.

Makrophagen machten den Großteil der Leukozyten aus (HC:  $92,50 \pm 1,50\%$  AoS:  $81,00 \pm 3,09\%$  AiS:  $75,43 \pm 4,47\%$ ), waren aber bei Asthmatikern signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe (HC vs. AoS p=0,0062; HC vs. AiS p=0,0010). Die neutrophilen Granulozyten machten die zweitgrößte Leukozytenpopulation aus (HC:  $6,55 \pm 1,44\%$  AoS  $10,92 \pm 2,42\%$  AiS:  $19,39 \pm 4,42\%$ ). Dabei war der Prozentsatz an Neutrophilen Granulozyten bei Asthmatikern „in season“ signifikant höher als bei den Kontrollprobanden (HC vs. AiS p=0,0051). Die eosinophilen Granulozyten waren die drittgrößte Leukozytenpopulation (HC:  $0,41 \pm 0,15\%$  AoS:  $3,35 \pm 0,90\%$  AiS:  $3,95 \pm 0,99\%$ ). Hier unterschieden sich die Asthmatiker zu beiden Zeitpunkten von den Kontrollprobanden (HC vs. AoS p= 0,0156; HC vs. AiS p= 0,0004). Die basophilen Granulozyten (HC:  $0,04 \pm 0,04\%$  AoS:  $1,85 \pm 0,58\%$  AiS:  $0,41 \pm 0,16\%$ ) waren in bei Asthmatikern „out of season“ im Vergleich zu Asthmatikern „in season“ und der Kontrollgruppe signifikant erhöht (HC vs. AoS p= 0,0040; HC vs. AiS p= 0,0031). Die



Lymphozyten waren in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

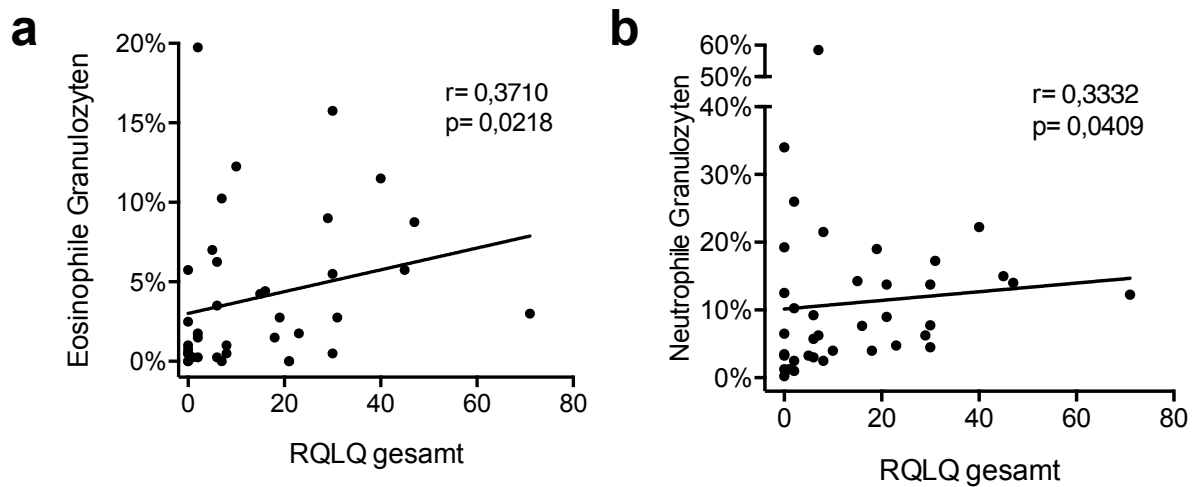


Abbildung 18: Die RQLQ-Gesamtsumme korreliert signifikant positiv mit (a) den Eosinophilen Granulozyten und (b) den Neutrophilen Granulozyten. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Je mehr eosinophile ( $r=0,3710$   $p=0,0218$ ) oder neutrophile ( $r=0,3332$   $p=0,0409$ ) Granulozyten im Sputum vorhanden waren desto schlechter gab der Patient die gesamte Lebensqualität zum jeweiligen Zeitpunkt an.

### 4.2.3 Durchflusszytometrie

Zur Identifizierung der im Sputum niedrigfrequent vorkommenden Lymphozyten wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hierdurch gelang eine Differenzierung in einzelne Subpopulationen der Lymphozyten, wobei hier auch der Fokus auf T-, B- und NK-Zellen lag.

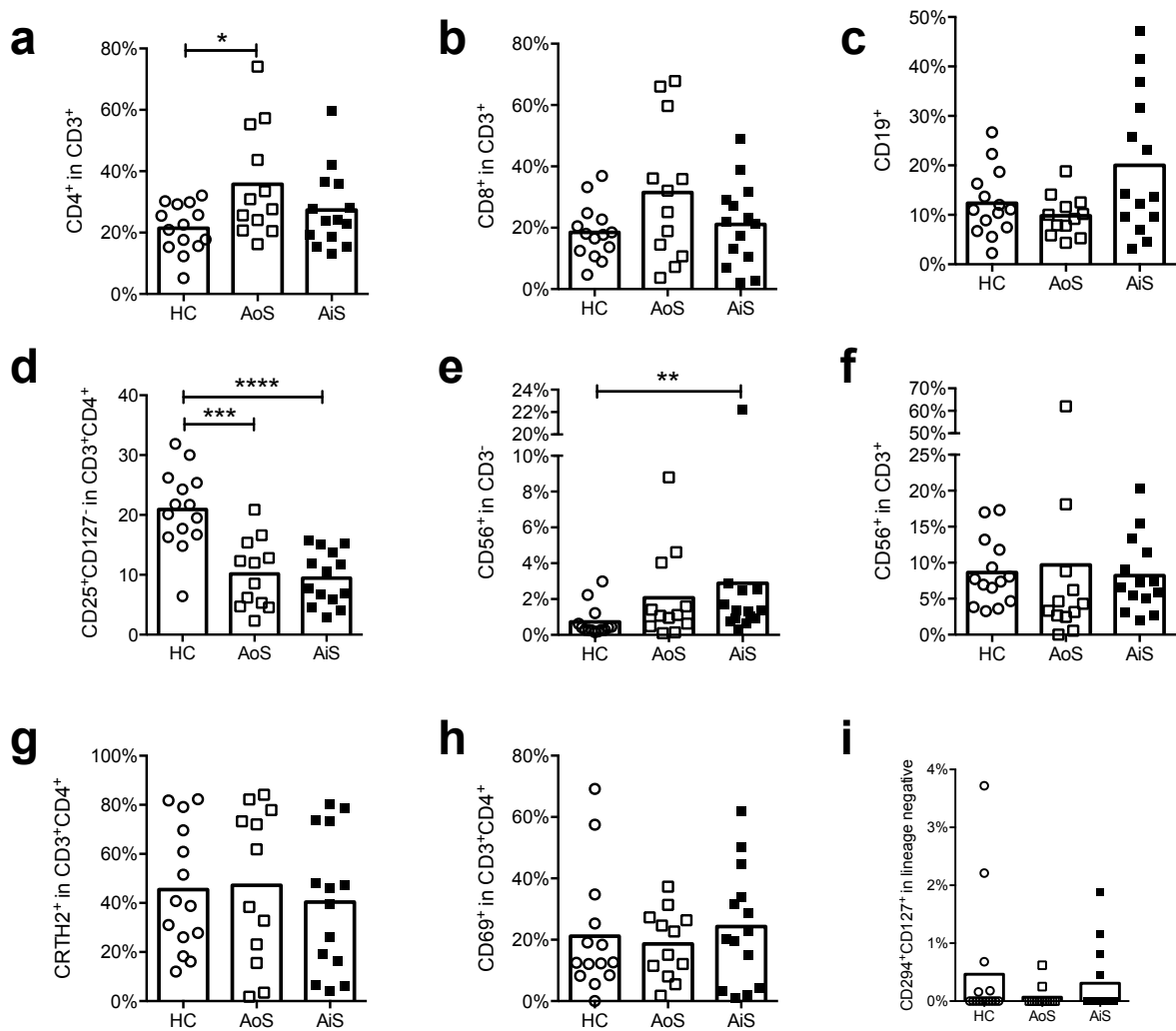


Abbildung 19: **Lymphozytenpopulationen im Sputum bei Durchflusszytometrie.** Im Vergleich sind jeweils die Probandengruppen Kontrollen (HC), Asthmatiker „out of season“ (AoS) und Asthmatiker „in season“ (AiS) dargestellt. Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. (a) T-Helferzellen: Asthmatiker out of season hatten einen signifikant höheren Anteil an T-Helferzellen im Sputum als Kontrollprobanden. (b) Zytotoxische T-Zellen (c) B-Zellen: Asthmatiker in season hatten einen tendenziell höheren Anteil an B-Zellen im Sputum als Asthmatiker „out of season“. (d) regulatorische T-Zellen: Asthmatiker „in season“ und „out of season“ hatten signifikant niedrigere Anteile an aktivierten T-Helferzellen im Sputum als Kontrollen. (e) NK-Zellen: Asthmatiker „in season“ hatten signifikant mehr NK-Zellen im Sputum als die Kontrollgruppe. (f) NK-T-Zellen (g) Th2-Zellen (h) Aktivierte T-Helferzellen mit CD69+ (i) ILC2s.

Zum Zeitpunkt „off season“ zeigten die gemessenen Probandengruppen HC und AoS signifikante Unterschiede in der Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. (HC: 21,43 ± 2,11% AoS: 35,79 ± 5,19% AiS: 27,36 ± 3,38%; HC vs. AoS p= 0,0310). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten einen leichten Anstieg in der off-season, der statistisch jedoch nicht signifikant war (HC: 18,52 ± 2,37% AoS: 28,58 ± 6,97% AiS 21,08 ± 3,63). Die Asthmatiker in season hatten in der Tendenz mehr CD19<sup>+</sup>-Zellen als Asthmatiker out of season (HC: 12,36 ± 1,79% AoS: 9,80 ± 1,18% AiS 20,03 ± 3,85%; AoS vs. AiS p=0,0841). CD56<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD3<sup>-</sup> Leukozytenpopulation, die als NK-

Zellen definiert wurden, waren in season gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (HC:  $0,72 \pm 0,23$ , AoS:  $2,08 \pm 0,74\%$  AiS:  $2,88 \pm 1,50\%$ ; HC vs. AiS  $p=0,0022$ ).  $CD25^+/CD127^-$ -Zellen innerhalb der  $CD3^+/CD4^+$ -Population, waren bei Asthmatikern zu beiden Zeitpunkten gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt (HC:  $20,92 \pm 1,76\%$ , AoS:  $9,46 \pm 1,29\%$ , AiS:  $10,14 \pm 1,54\%$ ; HC vs. AoS  $p= 0,0002$ ; HC vs. AiS  $p<0,0001$ ).  $CD56$ -positive T-Zellen (NKT-Zellen),  $CD294$ -positive TH2-Zellen,  $CD69$ -positive T-Helferzellen und ILC-Zellen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Frequenz des Auftretens.

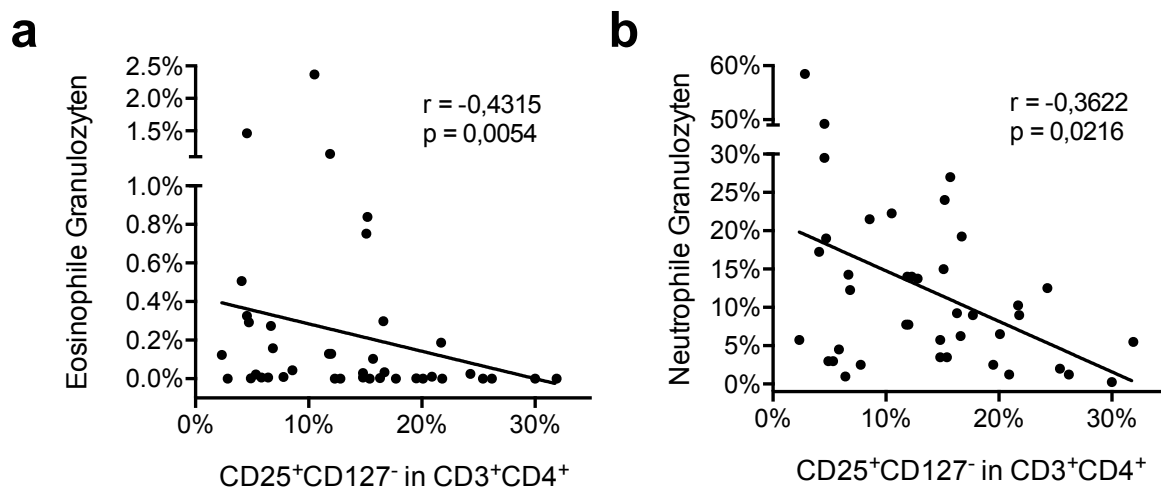


Abbildung 20: **Korrelation von  $CD25^+CD127^-$  in  $CD3^+CD4^+$  mit Lymphozytenpopulationen** (a) Negative Korrelation von  $CD25^+CD127^-$  in  $CD3^+CD4^+$  mit neutrophilen Granulozyten. (b) Negative Korrelation von  $CD25^+CD127^-$  in  $CD3^+CD4^+$  mit eosinophilen Granulozyten. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Bei der Korrelation von Zellen der Oberflächeneigenschaft  $CD25^+CD127^-$  in  $CD3^+CD4^+$  im Sputum mit der Auszählung von Zytospin-Präparaten des Sputums ergab sich eine mittel- bis geringgradige negative Korrelation mit dem Anteil an Neutrophilen Granulozyten und den Eosinophilen Granulozyten im Sputum. ( $CD25^+CD127^-$  in  $CD3^+CD4^+$  zu Neutrophilen  $r= -0,4315$ ,  $p= 0,0054$ ;  $CD25^+CD127^-$  in  $CD3^+CD4^+$  zu Eosinophilen  $r= -0,3622$ ,  $p= 0,0216$ ).

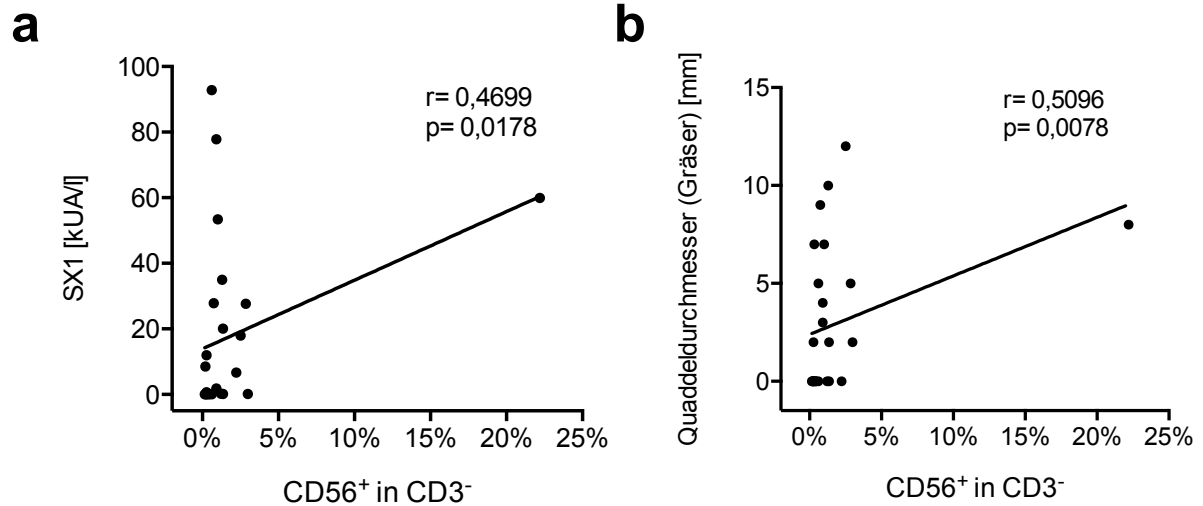


Abbildung 21: **Korrelation von CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-Zellen mit Allergiediagnostik** (a) Positive Korrelation von CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-Zellen mit dem Quaddeldurchmesser im Gräser-Pricktest. (b) Positive Korrelation von CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-Zellen mit Sx1-Antikörpern im Serum. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Es korrelieren CD56<sup>+</sup> in CD3<sup>-</sup>-Zellen positiv mit dem Durchmesser der Quaddeln beim Prick-Test mit Gräser-Allergen ( $r = 0,5096$ ,  $p = 0,0078$ ). Auch mit dem Test für Aeroallergen-spezifische Antikörper (Sx1) korrelieren diese Zellen positiv ( $r = 0,4699$ ,  $p = 0,0178$ ).

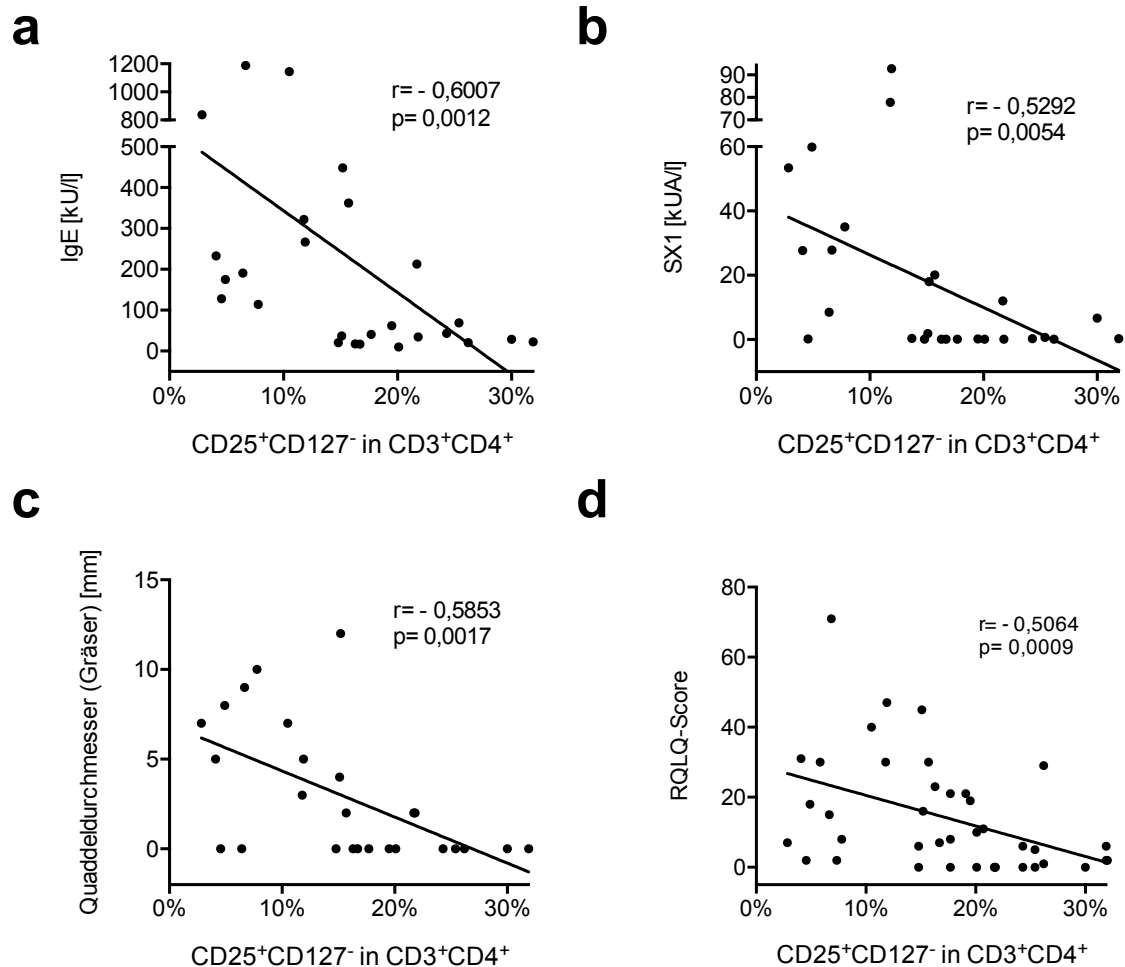


Abbildung 22: **Korrelation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> mit klinischen Parametern** (a) Negative Korrelation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> mit Gesamt-IgE im Serum. (b) Negative Korrelation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> mit Sx1. (c) Negative Korrelation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> mit Quaddeldurchmesser im Gräser-Pricktest. (d) Negative Korrelation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> mit RQLQ Gesamtsumme. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-regulatorische Zellen korrelieren negativ mit Gesamt-IgE ( $r = -0,6007$ ;  $p = 0,0012$ ) und Sx1-Antikörpern ( $r = -0,5292$ ;  $p = 0,0054$ ) im Serum, dem Quaddeldurchmesser im Gräser-Pricktest ( $r = -0,5853$ ;  $p = 0,0017$ ) sowie dem RQLQ ( $r = -0,5064$ ;  $p = 0,0009$ ). Die stärkste Korrelation zeigte sich dabei mit dem Gesamt-IgE.

## 4.3 Proteinbestimmung in sekretorischen Flüssigkeiten der unteren und oberen Atemwege

Nachdem die Zellen differenziert wurden, folgte als nächstes die Bestimmung der sekretierten Cytokine im Überstand des Sputums. Auch die sekretierten Cytokine im nasalen Sekret wurden gemessen. Die Cytokine sind geordnet nach Th-Phänotypen geordnet dargestellt.

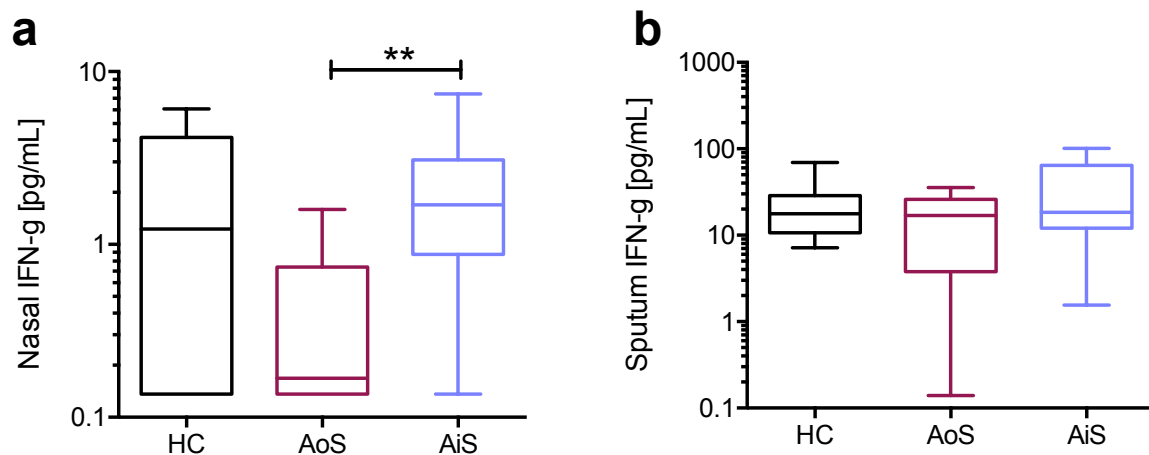


Abbildung 23: **Konzentration von Th1-Cytokin (IFN-g) in nasalem Sekret (a) und Sputum (b) bei Kontrollprobanden (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS).** Im nasalen Sekret zeigt sich eine signifikant erhöhte Konzentration an IFN- $\gamma$  bei AiS im Vergleich zu AoS. Darstellung als Median mit Interquartile Range. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Die Interferon-gamma-Konzentration war im nasalen Sekret bei Asthmatikern „in season“ im Vergleich zu „out of season“ signifikant erhöht (HC:  $2,14 \pm 0,61$ pg/ml, AoS:  $0,44 \pm 0,13$ pg/ml, AiS:  $2,38 \pm 0,65$ pg/ml; AoS vs. AiS  $p= 0,0010$ ). Auch im Wilcoxon-Test bestand zwischen Asthma „in season“ zu „out of season“ ein signifikanter Unterschied (AoS vs. AiS  $p= 0,0029$ ). Die Werte der IFN- $\gamma$ -Konzentration unterschieden sich im Sputum zwischen den Probandengruppen nur geringfügig.

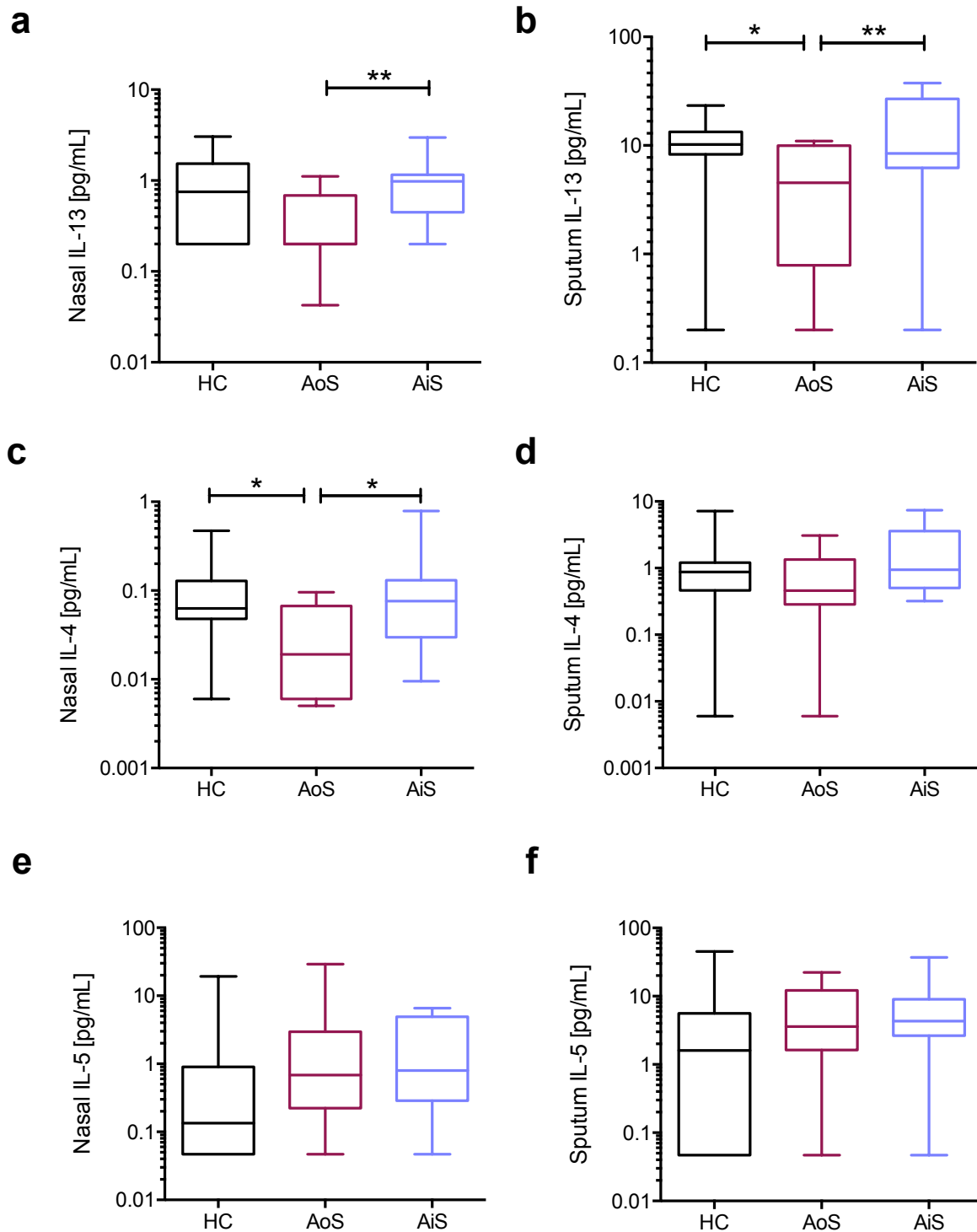


Abbildung 24: **Konzentration von Th2-Cytokinen (IL-13, IL-4 und IL-5) in nasalem Sekret (a,c,e) und Sputum (b,d,f) bei Kontrollprobanden (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS).** IL-13 zeigt sowohl in nasalem Sekret als auch in Sputum signifikant niedrigere Spiegel bei AoS als die anderen Probandengruppen. IL-4 zeigt im nasalen Sekret einen signifikanten Unterschied von AoS zu HC und AiS. Darstellung als Median mit Interquartile Range. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Die IL-13-Konzentration im nasalen Sekret war bei Asthmatikern „out of season“ im Vergleich zur Kontrollgruppe und Asthmatikern „in season“ signifikant erniedrigt (HC:

0,94 ± 0,24pg/ml, AoS: 0,38 ± 0,10pg/ml, AiS: 1,03 ± 0,22pg/ml; AoS vs. AiS p= 0,0061). Im Sputum konnten kongruente Beobachtungen gemacht werden. Bei Asthmatikern „out of season“ war die IL-13-Konzentration im Sputum signifikant niedriger als bei Asthmatikern „in season“ und Kontrollprobanden (HC: 11,18 ± 1,59pg/ml, AoS: 5,15 ± 1,20 pg/ml, AiS: 14,92 ± 3,60pg/ml; HC vs. AoS p= 0,0111; AoS vs. AiS = 0,0061).

Bei Analyse der IL-4-Konzentration zeigte sich im nasalen Sekret ebenfalls ein statistisch signifikant erniedrigtes IL-4 bei Asthmatikern „out of season“ zu den anderen Probandengruppen (HC: 0,10 ± 0,03pg/ml, AoS: 0,03 ± 0,01 pg/ml, AiS: 0,13 ± 0,06pg/ml; HC vs. AoS p= 0,0159; AoS vs. AiS = 0,0059). Die IL-4-Konzentration im Sputum war im Vergleich der Asthmatiker-Gruppen „in season“ höher aber nicht signifikant unterschiedlich. IL-5 zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Probandengruppen.



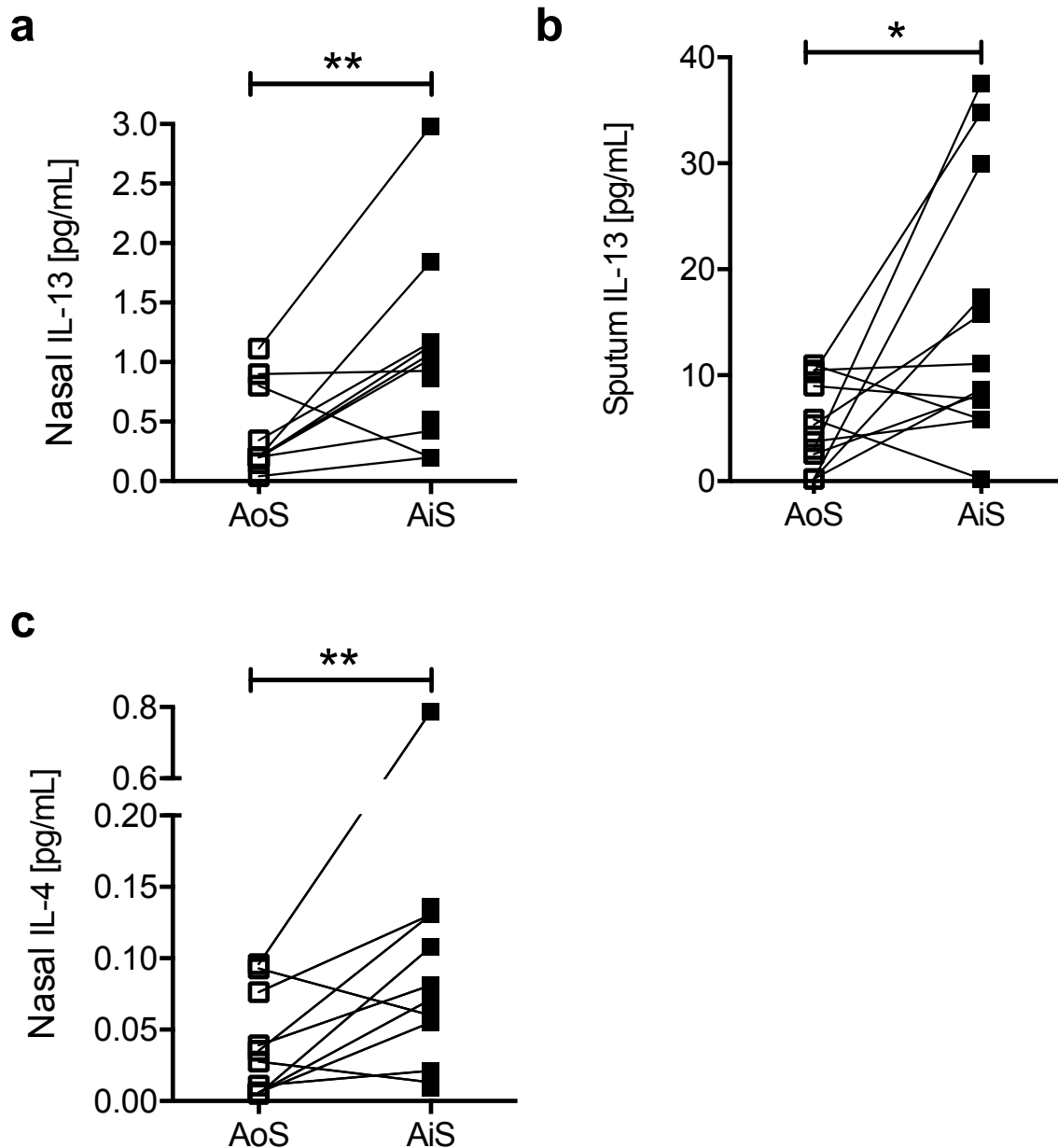


Abbildung 25: **Konzentration von (a) IL-13 im nasalen Sekret und (b) IL-13 im Sputum sowie (c) IL-4 im nasalen Sekret von Asthmatikern „out of season“ (AoS) und „in season“ (AiS) mit Verbindungslinien.** Die Th2-Mediatoren (a,b) IL-13 und (c) IL-4 sind jeweils bei Asthmatikern „in season“ im Vergleich zu „out of season“ signifikant erhöht. Die Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test.

In der gepaarten Testung stieg IL-13 im nasalen Sekret und im Sputum von „out of season“ zu „in season“ signifikant an (Nasal: AoS vs. AiS  $p=0,0049$ ; Sputum: AoS vs. AiS  $p=0,0269$ ). Ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration konnte ebenfalls für IL-4 bei Asthmatikern „in season“ gegenüber „out of season“ gezeigt werden (AoS vs. AiS  $p=0,0093$ ).

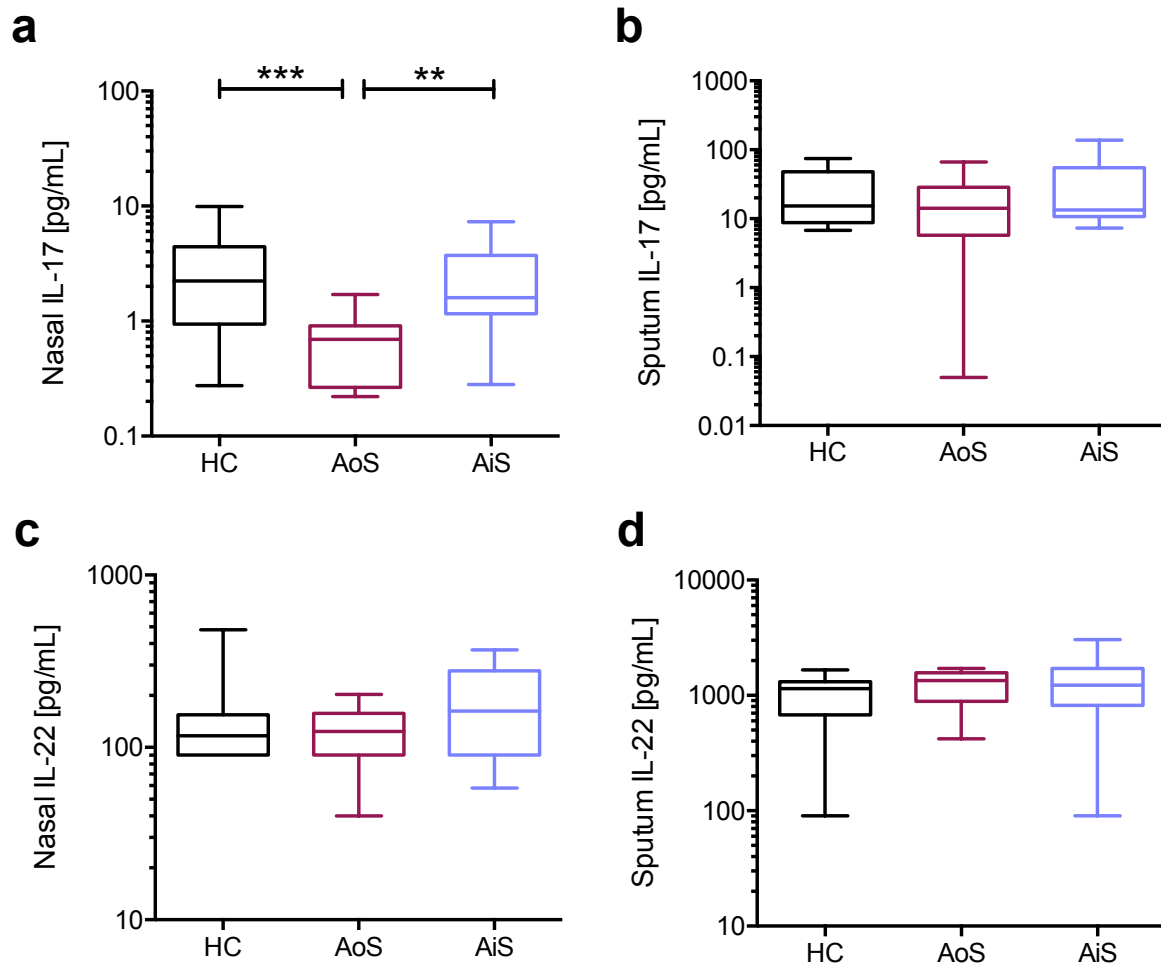


Abbildung 26: **Konzentration von Th17-Cytokinen (IL-17, IL-22)** in nasalem Sekret (a und c) und Sputum (b und d) bei Kontrollprobanden (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS). Die IL-17-Konzentration im nasalen Sekret von AoS ist gegenüber HC und AiS signifikant erniedrigt. Darstellung als Median mit Interquartile Range. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Die IL-17-Konzentration ist bei Asthmatikern „out of season“ gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (HC:  $3,29 \pm 0,89$ pg/ml, AoS:  $0,90 \pm 0,22$ pg/ml, AiS:  $2,41 \pm 0,59$ pg/ml; HC vs. AoS  $p = 0,0006$ ). Zum Zeitpunkt „in season“ ist die Konzentration von IL-17 jedoch im Vergleich zu „out of season“ signifikant erhöht (AoS vs. AiS =  $0,0014$ ).

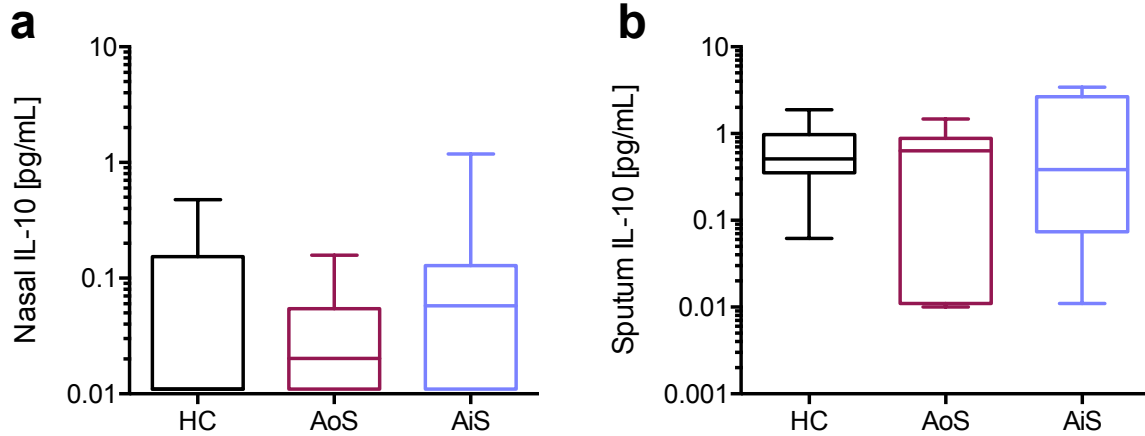


Abbildung 27: **Konzentration von antiinflammatorischen Cytokinen (IL-10)** in nasalem Sekret (a) und Sputum (b) bei Kontrollprobanden (HC) und Asthmatikern „out of season“ (AoS) und „in season“ (AiS). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probandengruppen. Darstellung als Median mit Interquartile Range. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Bei der IL-10-Konzentration zeigten sich weder im nasalen Sekret noch im Sputum signifikante Unterschiede.

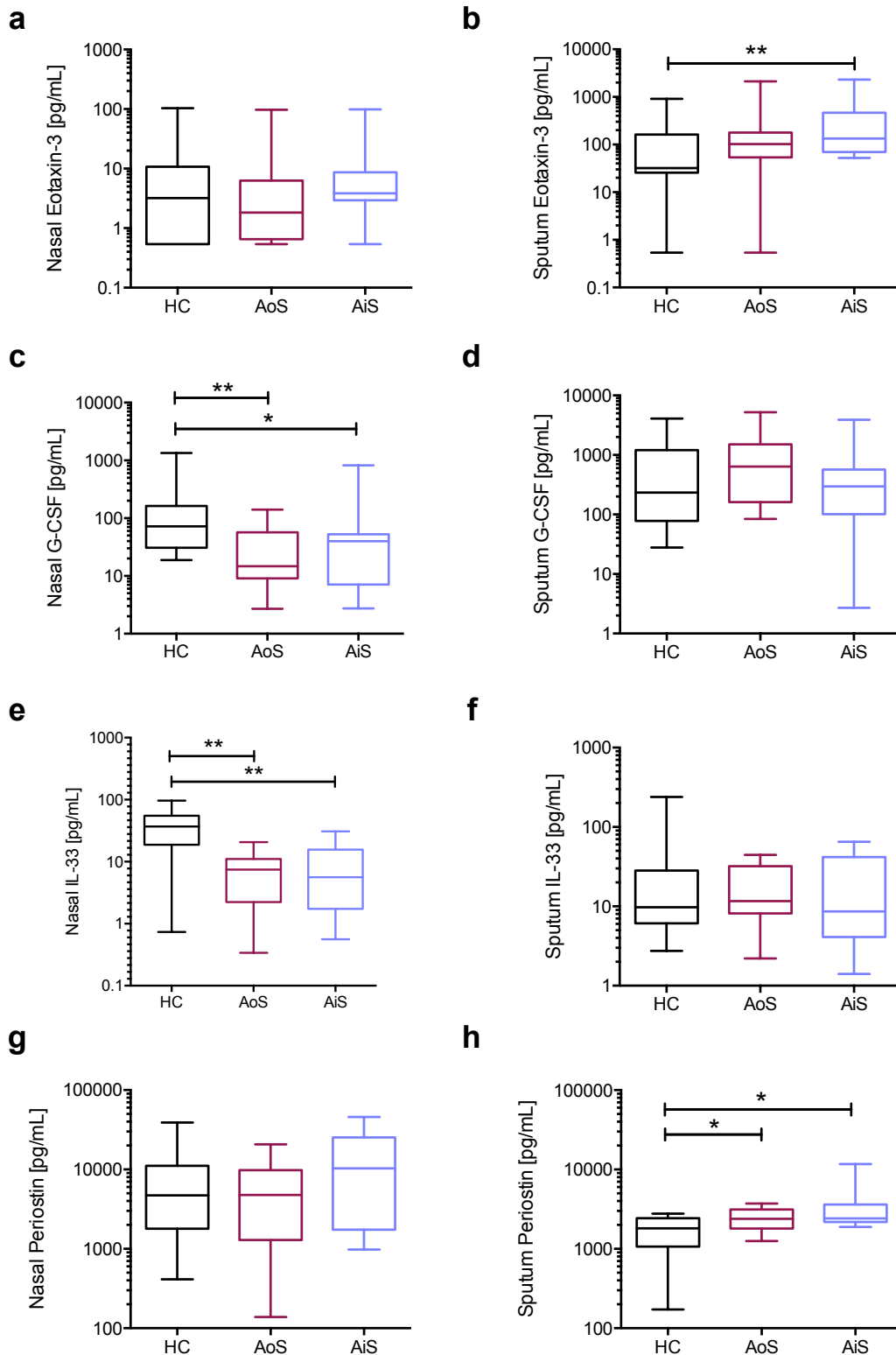


Abbildung 28: **Konzentration von proinflammatorischen lokalen Cytokinen mit epithelialer Abstammung (Eotaxin-3, G-CSF, IL-33, TNF-a und Periostin) in nasalem Sekret (a,c,e,g) und Sputum (b,d,f,h) bei Kontrollprobanden (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS). Die Eotaxin-3-Konzentration im Sputum war bei AiS signifikant höher als bei HC. Im nasalen Sekret war die G-CSF-Konzentration gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt. Ebenfalls im nasalen Sekret wurden signifikante höhere IL-33-Spiegel bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu AiS und AoS gemessen. Periostin im Sputum war bei AiS signifikant höher als bei HC. Darstellung als Median mit Interquartile Range. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.**

Bei Eotaxin-3 im Sputum konnte ein höherer Spiegel bei Asthmatikern in season als bei den Kontrollprobanden gemessen werden (HC:  $15,70 \pm 70,32$ pg/ml, AoS:  $265,98 \pm 170,09$ pg/ml, AiS:  $382,11 \pm 182,70$ pg/ml; HC vs. AiS  $p= 0,0077$ ). Im nasalen Sekret war der Eotaxin-Spiegel vor allem bei Asthmatikern „out of season“ erniedrigt, es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Erhöhung der G-CSF-Konzentration im nasalen Sekret bei Kontrollprobanden war im Vergleich zu den Asthmatikern signifikant (HC:  $205,76 \pm 101,46$ pg/ml, AoS:  $37,86 \pm 13,62$ pg/ml, AiS:  $97,93 \pm 66,24$ pg/ml; HC vs. AoS  $p=0,0080$ ; HC vs. AiS  $p= 0,0343$ ). Insgesamt unterschied sich die IL-33-Konzentration im nasalen Sekret von Kontrollprobanden hochsignifikant von Asthmatikern. Die Asthmatiker hatten zu beiden Zeitpunkten eine geringere Konzentration von IL-33 in ihrem nasalen Sekret (HC:  $38,58 \pm 7,70$ pg/ml, AoS:  $7,87 \pm 1,82$ pg/ml, AiS:  $9,19 \pm 2,74$ pg/ml; HC vs. AoS  $p=0,0019$ ; HC vs. AiS  $p= 0,0024$ ). Auch Periostin zeigte im Sputum eine signifikante Erhöhung bei Asthmatikern gegenüber der Kontrollgruppe (HC:  $1680,37 \pm 215,88$ pg/ml, AoS:  $2452,85 \pm 214,70$ pg/ml, AiS:  $3529,28 \pm 801,22$ pg/ml; HC vs. AoS  $p=0,0148$ ; HC vs. AiS  $p= 0,0355$ ). Die Periostin-Spiegel im Nasensekret waren kongruent zum Sputum, jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

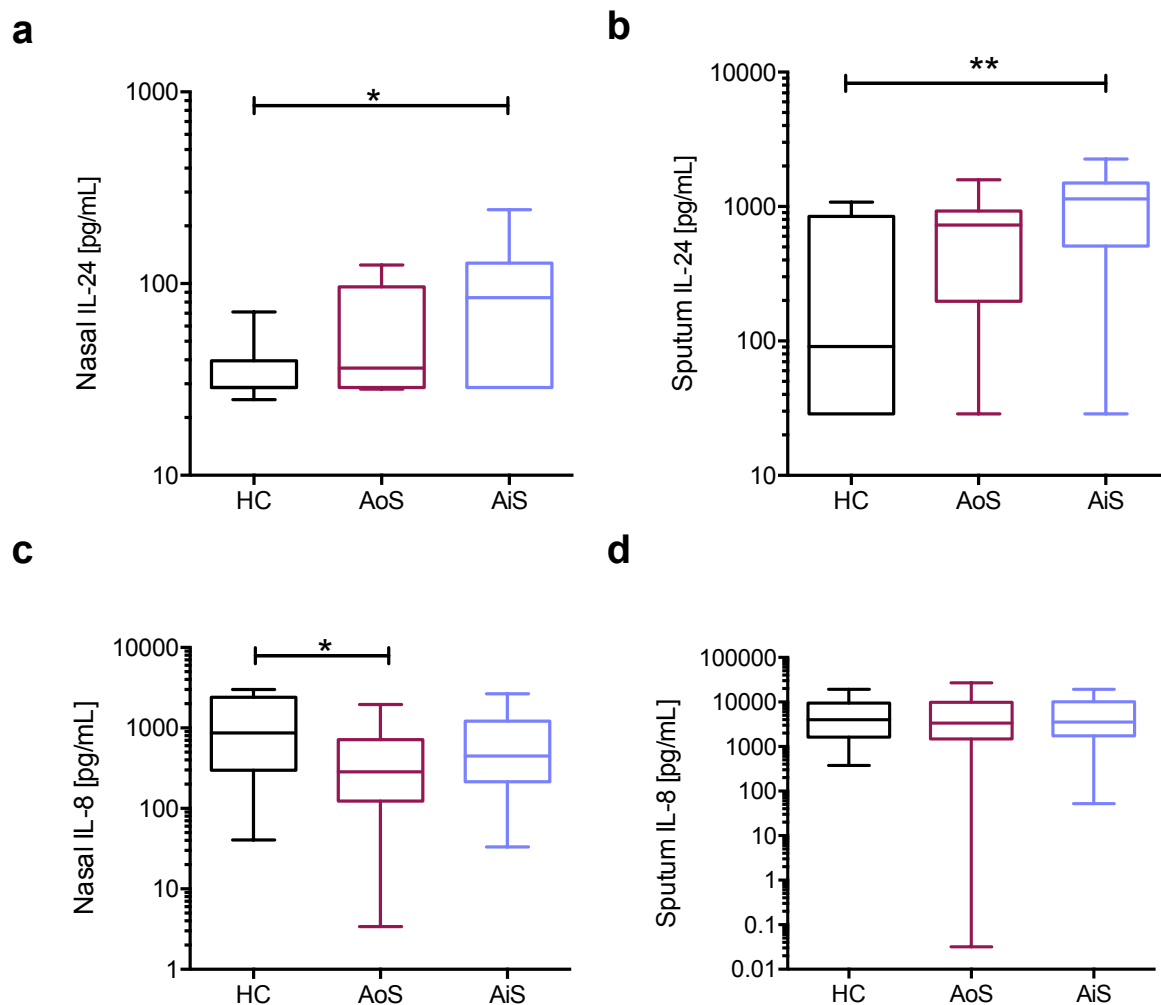


Abbildung 29: **Konzentration von proinflammatorischen lokalen Cytokinen aus Infiltrat oder epithelialer Abstammung (IL-24, IL-8)** in nasalem Sekret (a,c) und Sputum (b,d) bei Kontrollprobanden (HC), Asthmatikern „out of season“ (AoS) und Asthmatikern „in season“ (AiS). Die IL-24-Konzentration im nasalen Sekret war bei AiS signifikant höher als bei HC. Im Sputum war der IL-24-Spiegel bei AiS ebenfalls signifikant höher als bei HC. Ebenfalls im nasalen Sekret wurden signifikante höhere IL-8-Spiegel bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu AoS gemessen. Darstellung als Median mit Interquartile Range. Die Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Die IL-24-Konzentration von Asthmatikern „in season“ war sowohl im nasalen Sekret (HC:  $35,09 \pm 3,72$ /ml, AoS:  $59,63 \pm 11,13$ pg/ml, AiS:  $93,63 \pm 20,76$ pg/ml; HC vs. AiS  $p= 0,0259$ ), als auch im Sputum gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (HC:  $361,04 \pm 111,14$ /ml, AoS:  $641,20 \pm 131,66$ pg/ml, AiS:  $1084,09 \pm 199,55$ pg/ml; HC vs. AiS  $p= 0,0093$ ). Für IL-8 im nasalen Sekret war eine signifikant niedrigere Konzentration bei Asthmatikern „out of season im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (HC:  $1251,22 \pm 294,50$ pg/ml, AoS:  $491,54 \pm 159,11$ pg/ml, AiS:  $803,49 \pm 239,69$ pg/ml; HC vs. AoS  $p= 0,0396$ ).

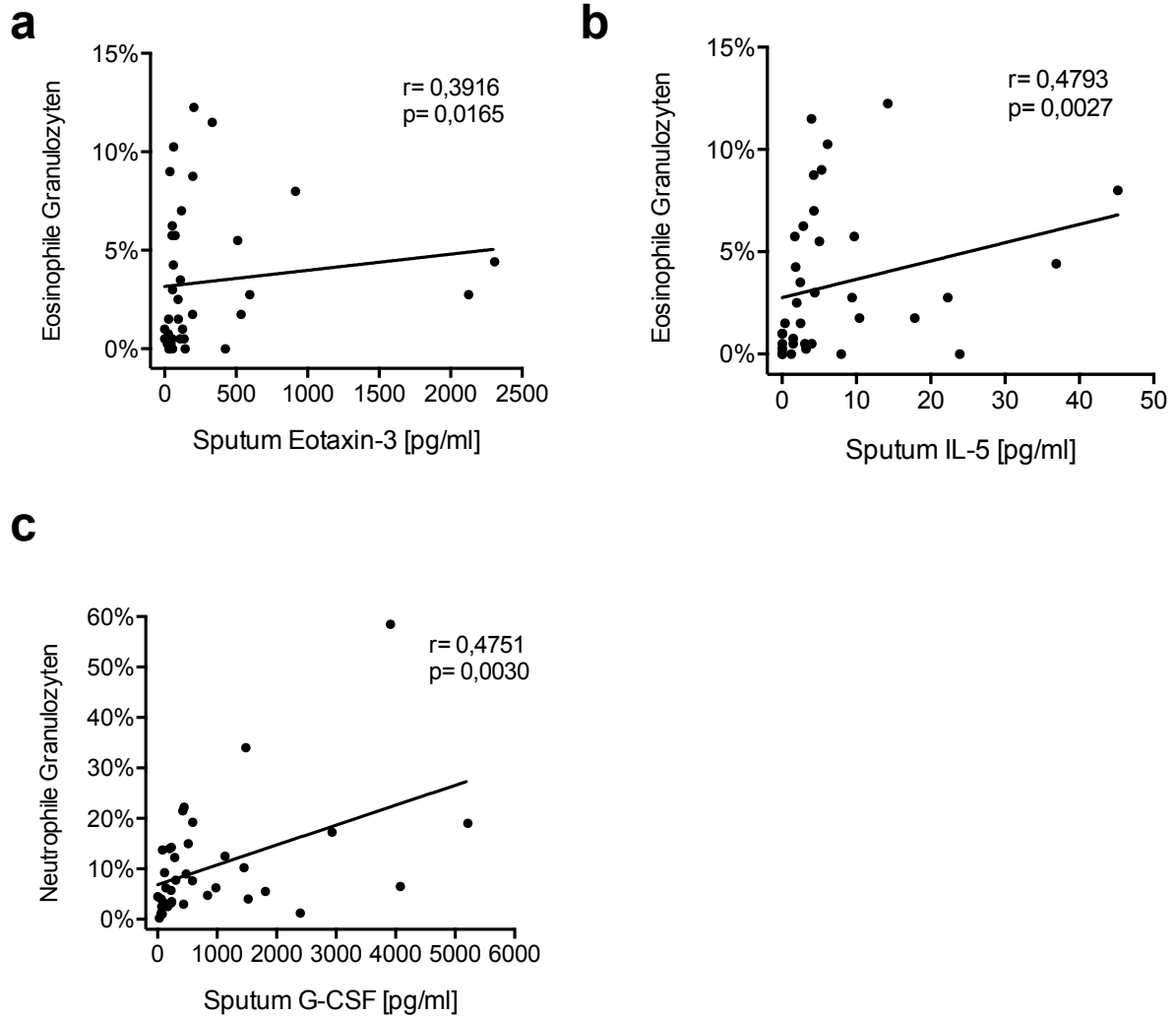


Abbildung 30: **Korrelation zwischen Zellpopulationen der zytologischen Differenzierung und Proteinmengen in den Sputumüberständen.** (a) Die Konzentration an Eotaxin-3 im Sputum korreliert mit den eosinophilen Granulozyten. (b) Die Konzentration an IL-5 im Sputum korreliert mit den eosinophilen Granulozyten. (c) Die Konzentration von G-CSF im Sputum korreliert mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Die Höhe des Eotaxin-3-Spiegels im Sputum der Probanden korreliert mit dem relativen Vorkommen von eosinophilen Granulozyten im Sputum ( $r = 0,3916$   $p = 0,0165$ ). Der IL-5-Spiegel im Sputum korreliert stärker als Eotaxin-3 mit den eosinophilen Granulozyten im Sputum ( $r = 0,4793$   $p = 0,0027$ ). Die Konzentration von G-CSF im Sputum korreliert signifikant mit dem prozentualen Vorkommen von neutrophilen Granulozyten im Sputum ( $r = 0,4751$   $p = 0,0030$ ).

Da das erhöhte Vorkommen von eosinophilen Granulozyten im Sputum phänotypisch für allergisches Asthma ist, wurde der Zusammenhang des chemotaktisch auf Eosinophile wirkenden Botenstoffs Eotaxin-3 mit den Ergebnissen der Sensibilisierungsdiagnostik überprüft.

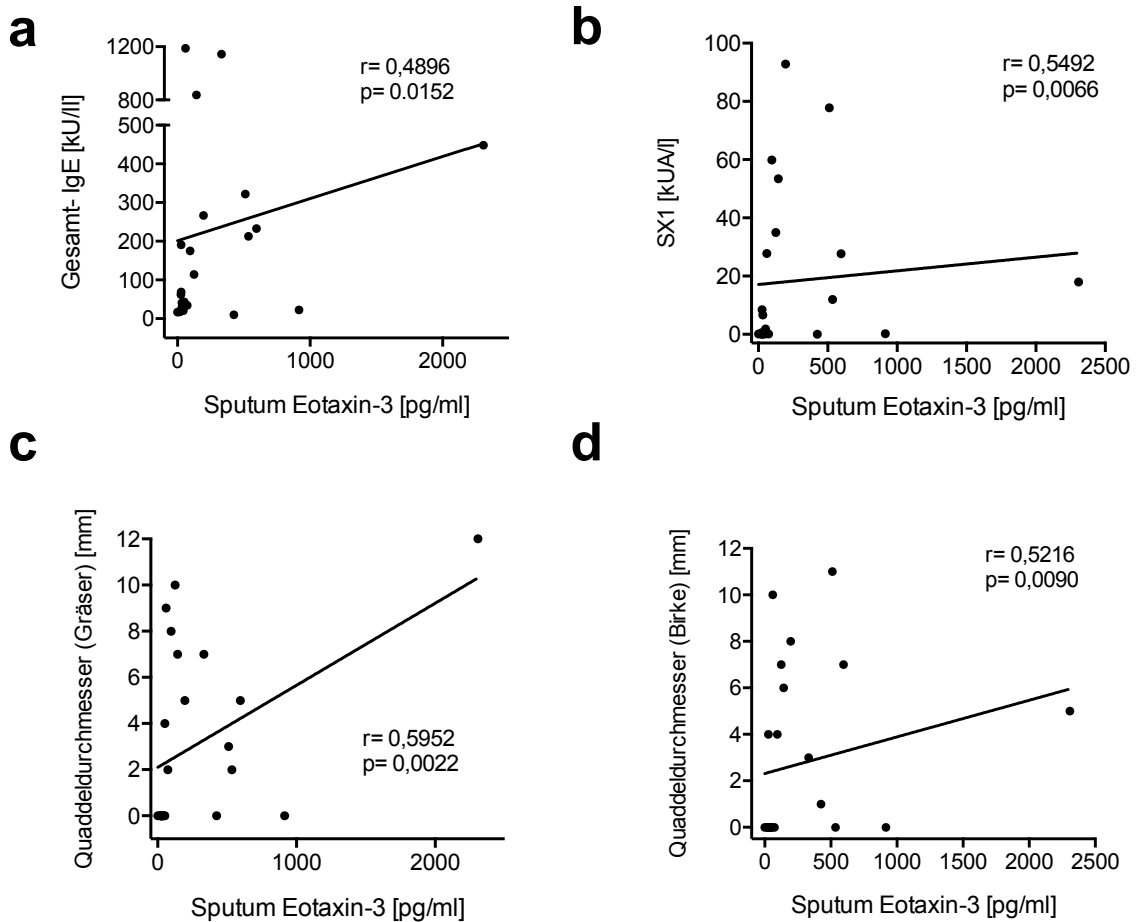


Abbildung 31: **Korrelation von Eotaxin-3 zur Allergiediagnostik.** Eotaxin-3 zu (a) IgE-Konzentration, (b) Sx-1-AK-Konzentration, (c) Quaddeldurchmesser im Gräser-Pricktest und (d) Quaddeldurchmesser im Birke-Pricktest. Eotaxin-3 korreliert signifikant positiv mit den durchgeführten Allergietests. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Die Konzentration von Eotaxin-3 im Sputum korreliert mit der IgE-Konzentration und der Sx1-Antikörper-Konzentration im Serum (IgE:  $r= 0,4896$ ,  $p=0,0152$ ; Sx1:  $r=0,5492$ ,  $p=0,0066$ ). Außerdem wurde eine signifikante, positive Korrelation zwischen Eotaxin-3-Konzentration im Sputum und dem Quaddeldurchmesser im Prick-Test mit Gräser-Allergenen ( $r= 0,5952$ ,  $p= 0,0022$ ) und Birke-Allergenen gemessen ( $r= 0,5216$ ,  $p= 0,0090$ ).

Auch der Zusammenhang zwischen Biomarkern im Sputum und regulatorischen T-Zellen wurde untersucht und erbrachte folgende signifikante Korrelationen.



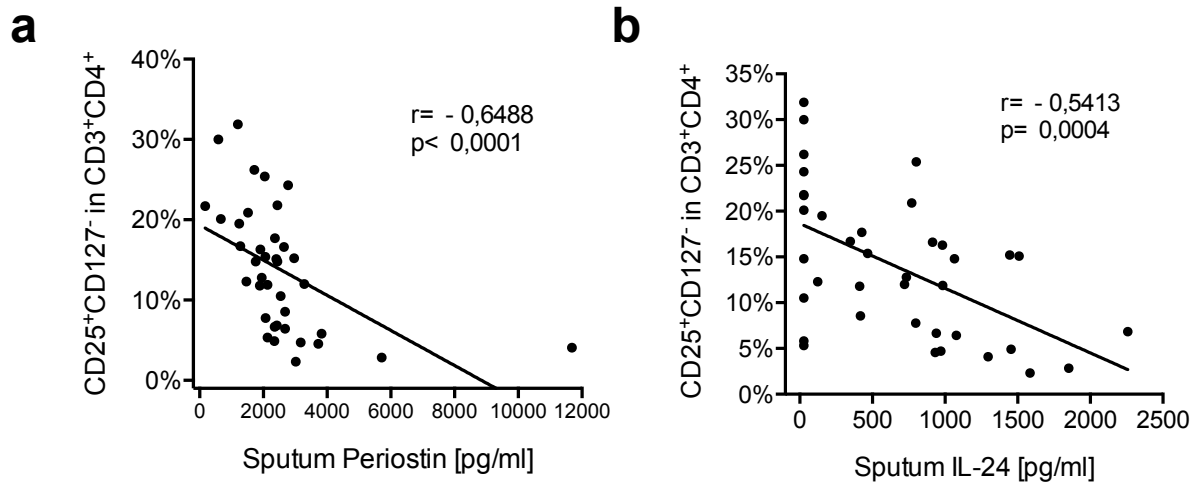


Abbildung 32: **Korrelation von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs und Sputum Biomarkern.** Die (a) Periostin-Konzentration im Sputum und (b) IL-24-Konzentration im Sputum korreliert mit der Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Sputum. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Sputum Periostin und IL-24 zeigten eine negative Korrelation mit CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-regulatorischen Zellen (Periostin:  $r = -0,6488$ ,  $p < 0,0001$ ; IL-24:  $r = -0,5413$ ,  $p = 0,0004$ ).

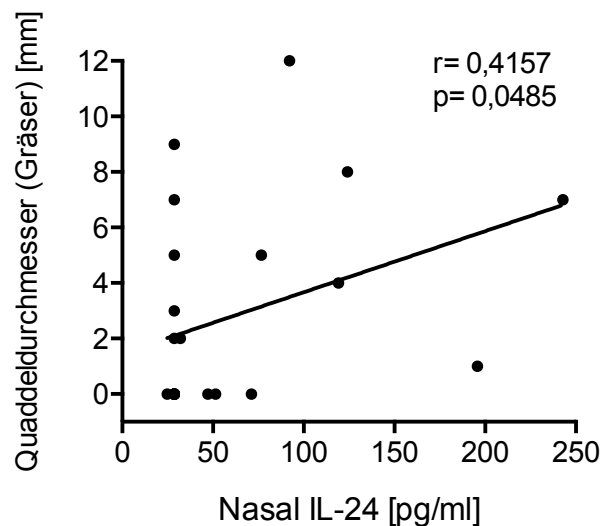


Abbildung 33: **Korrelation der Quaddeldurchmessers im Gräserpollen-Pricktest mit den nasalen Spiegeln von IL-24.** Die IL-24-Konzentration im nasalen Sekret korreliert mit dem Quaddeldurchmesser im Gräser-Pricktest. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Die IL-24-Konzentration im nasalen Sekret korreliert positiv mit der Größe des Quaddeldurchmessers bei Pricktest mit Gräser-Antigenen bei allen Probanden ( $r = 0,4157$   $p = 0,0485$ ).

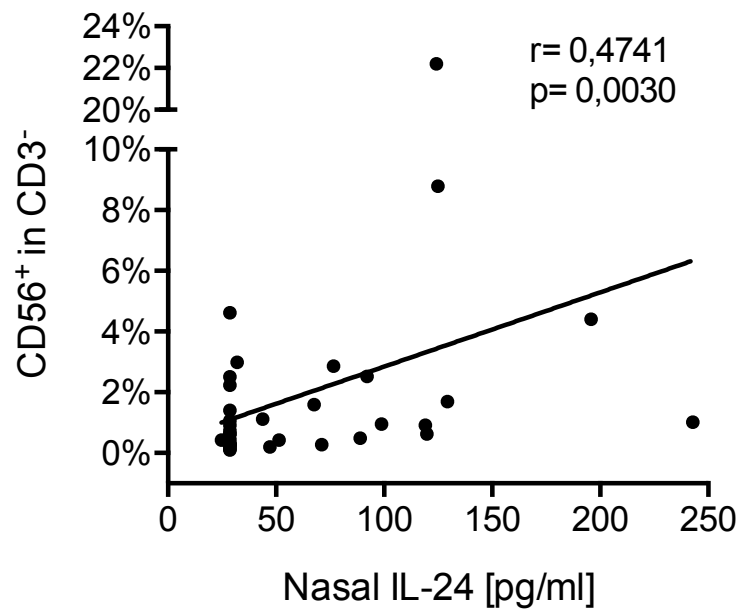


Abbildung 34: **Korrelation von NK-Zellen mit IL-24.** Die IL-24-Konzentration im Sputum korreliert positiv mit NK-Zellen (CD56+CD3-) im Sputum. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Es korrelierte die im nasalen Sekret gemessene IL-24-Konzentration positiv mit dem Anteil der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen in der Durchflusszytometrie des Sputums ( $r=0,4741$ ,  $p=0,0030$ ).

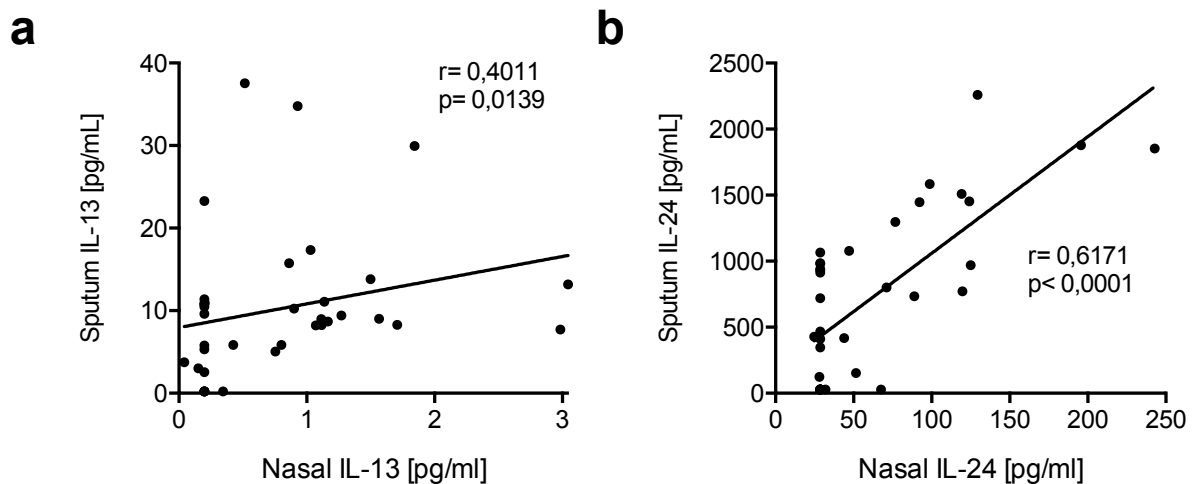


Abbildung 35: **Korrelation von Biomarkern in oberen und unteren Atemwegen** (a) IL-13-Konzentration im nasalen Sekret korreliert mit der IL-13-Konzentration im Sputum und die (b) IL-24-Konzentration im nasalen Sekret korreliert mit der IL-24-Konzentration im Sputum. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Die oberen und unteren Atemwege zeigen jeweils eine positive Korrelation bei den IL-4-assoziierten Biomarker IL-24 und IL-13.

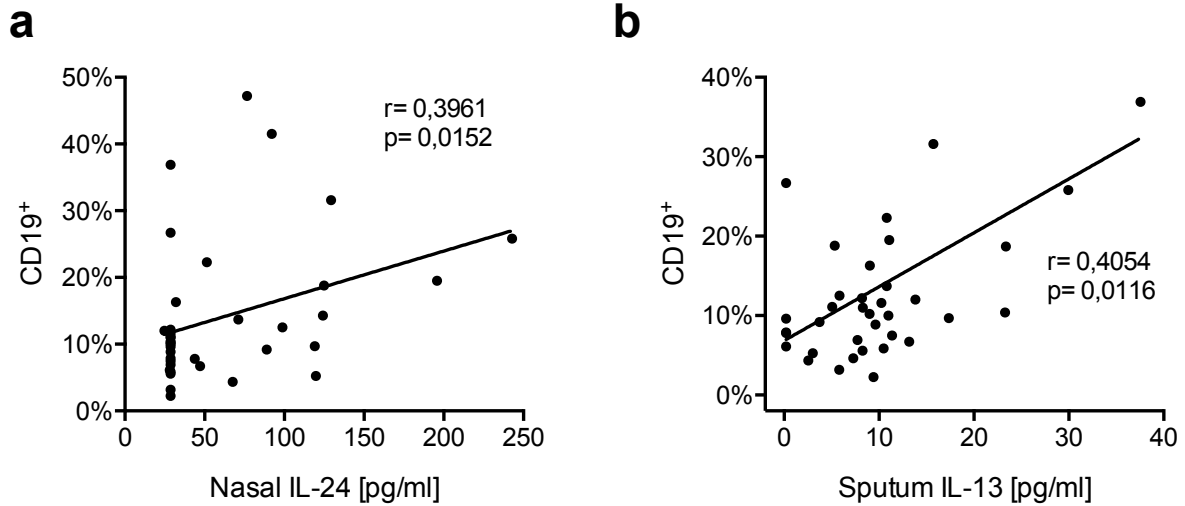


Abbildung 36: **Korrelation von Biomarkern mit B-Zellen im Sputum.** Die (a) IL-24-Konzentration im Sputum und die (b) IL-13-Konzentration im nasalen Sekret korreliert mit dem prozentualen Vorkommen von B-Zellen (CD19+) im Sputum. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Im Sputum korrelierte die Konzentration an IL-24 und im nasalen Sekret die Konzentration an IL-13 signifikant mit dem prozentualen Anteil der CD19-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie des Sputums (IL-24:  $r = 0,3961$ ,  $p = 0,0152$ ; IL-13:  $r = 0,4054$ ,  $p = 0,0116$ ).

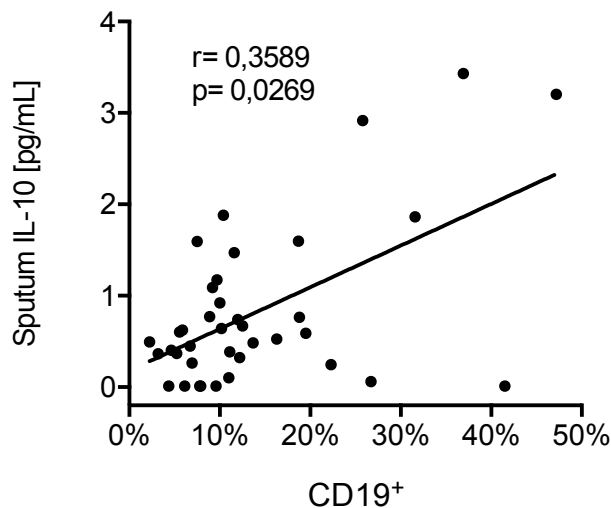


Abbildung 37: **B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) im Sputum korrelieren mit der IL-10-Konzentration im Sputum.** Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelation.

Je mehr CD19<sup>+</sup>-B-Zellen im Sputum vorhanden waren, desto mehr IL-10 konnte im Sputum gemessen werden ( $r = 0,3589$   $p = 0,0269$ ).

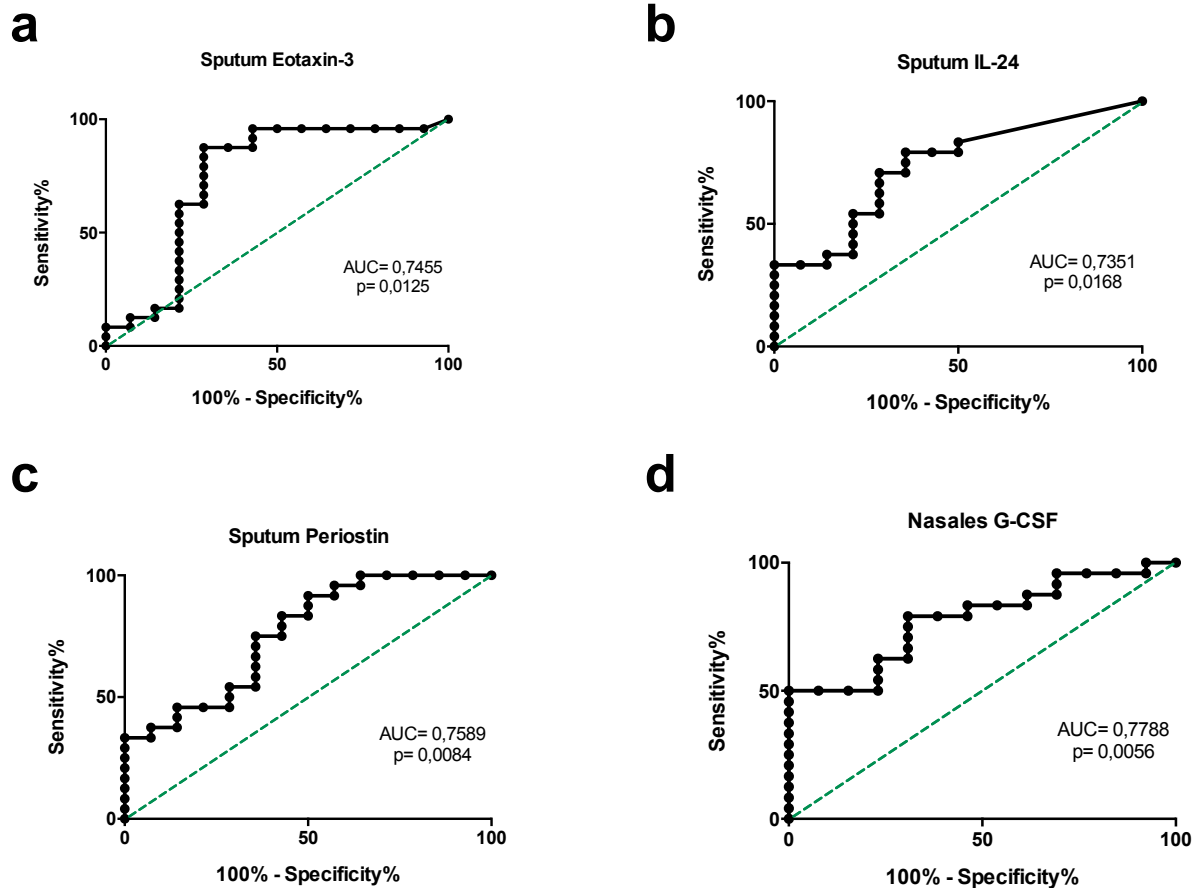


Abbildung 38: **ROC-Analyse der lokalen Proteine zur Klassifizierung in die Gruppe der Asthmatiker oder Kontrollprobanden.** (a) Eotaxin-3 im Sputum, (b) IL-24 im Sputum (c) Periostin im Sputum und (d) G-CSF im nasalen Sekret (n=38).

Der ROC-Test gibt mittels des AUC (Area under the curve) die Wahrscheinlichkeit an mit der ein Test zwei zufällig ausgeloste Wertepaare in die richtigen Kategorien zuordnet. Dabei gelang es mittels Eotaxin-3 im Sputum zu 74,6%, IL-24 im Sputum zu 73,5% und Periostin im Sputum zu 75,9% ein zufälliges Wertepaar richtig der Gruppe Asthmatiker bzw. Kontrollproband zuzuordnen. Erstaunlicherweise gelang dies mittels G-CSF im nasalen Sekret sogar mit 77,9% Genauigkeit.

### ROC curve: Sputum IL-24 classifies GINA <0 or GINA >0

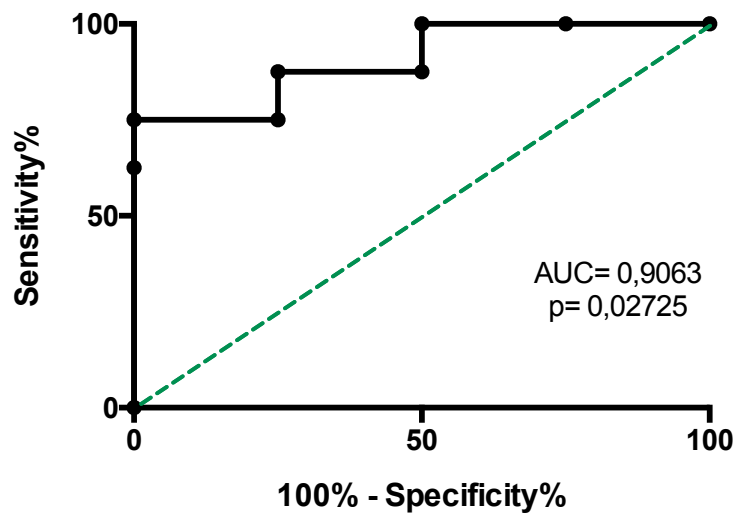


Abbildung 39: ROC-Analyse von IL-24 im Sputum zur Klassifizierung in GINA>0 und GINA<0 (n=12).

Mittels des Interleukins-24 konnte sogar mit einer Genauigkeit von 90,6% zwischen einem Probanden mit unkontrolliertem und kontrolliertem Asthma unterschieden werden.

# 5 Diskussion

## 5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die technische Durchführung der Durchflusszytometrie und Biomarkeranalyse bei induziertem Sputum erprobt und angepasst, um die lokal präsenten Leukozytenpopulationen mit lokalen Biomarkern zu vergleichen. Durch Analyse der in das nasale Lumen sezernierten Biomarker wurden zusätzlich die oberen Atemwege mit den unteren Atemwegen im Hinblick auf die „United Airways“-Hypothese (Braunstahl, 2007) verglichen. Es konnte „in season“ bei 14 Probanden, „out of season“ bei 12 Probanden und bei 14 Kontrollprobanden erfolgreich Sputum induziert werden. Die Probanden wurden klinisch mittels Lungenfunktion, Serum-Gesamt-IgE und Sx1-ImmunoCap, Pricktest sowie Fragebögen zur Lebensqualität und psychischem Stress charakterisiert. Gewonnene Sputa wurden per mikroskopischer Zellzählung und Durchflusszytometrie auf ihre vorherrschenden Leukozyten untersucht. Zusätzlich wurden Proteine mittels Elektrochemilumineszenz in nasalem Sekret und Sputumüberständen gemessen. Erstmals konnte eine große Bandbreite an Zytokinen in lokalen Sekretionen von Nase und Lunge genau quantifiziert werden und mit dem lokalen Zellvorkommen sowie den klinischen Charakteristika der Patienten verglichen werden. Innerhalb der drei Probandengruppen zeigten sich individuelle Muster von Leukozyten und Zytokinen in den lokalen Sekreten. Dabei wurden im Sputum signifikant erhöhte Mengen an NK-Zellen und signifikant erniedrigte Level an T-Helferzellen gefunden, denen eine wachsende Bedeutung im allergischen Asthma zugemessen wird. Auch die zugehörigen Zytokine waren bei Asthmatikern während des Graspollenfluges („in der Saison“) verändert und könnten zu einer genaueren Erklärung der Pathophysiologie von Asthma beitragen. So korrelierten IL-24 und Periostin nicht nur mit molekularbiologischen Untersuchungszielen, sondern erwiesen sich auch als „Identifikator“ für klinische Parameter und könnten in Zukunft als Verlaufsmarker bei allergischem Asthma verwendet werden.

## 1.1. Diskussion von Material und Methoden

Es wurde eine Kohortenstudie mit zwei Messzeitpunkten innerhalb eines Jahres durchgeführt. Dabei wurden die Kohorten genau definiert und anschließend untersucht. Anhand dieses Versuchsdesigns konnten jedoch lediglich deskriptive Daten erhoben werden, ein direkter, kausaler Zusammenhang kann im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Die Probanden der „saisonalen allergischen Asthmatiker“ und die gesunden Kontrollen ergaben aufgrund der Einschlusskriterien abgegrenzte und relativ homogene Gruppen. Hierbei zu beachten ist jedoch, dass die Asthmatiker teilweise auch unter dem Einfluss immunmodulierender Therapien standen. Dabei waren sechs Probanden unter inhalativer Steroidtherapie und sechs Probanden unter laufender bzw. nach allergenspezifischer Immuntherapie. Eine weitere Unterteilung der Gruppen hätte bei der technisch limitierten Kohortengröße jedoch eine notwendige statistische Power verhindert.

Induziertes Sputum ist mittlerweile eine etablierte Methode zur Gewinnung von zellulären und flüssigen Proben aus den unteren Atemwegen (Eickmeier et al., 2010). Dabei finden sich im Atemwegslumen Plugs aus Mucus, welche Leukozyten, Serumproteine und Zellrückstände enthalten (Bateman et al., 2008). Die Erstbeschreibung dieser Technik geht auf Pin et al. zurück (Pin et al., 1992) und wurde seitdem fortlaufend weiterentwickelt und ist mittlerweile standardisiert (Eickmeier et al., 2010; LaPan et al., 2010; Vlachos-Mayer, Leigh, Sharon, Hussack, & Hargreave, 2000). In unserer Studie wurde die von Ryttila et al. vorgeschlagene Staffelung mit 3%-iger, 4%-iger und 5%-iger NaCl-Lösung verwendet (Ryttila, Lindqvist, & Laitinen, 2000) und jeweils für 7 Minuten induziert (U. Zissler, 2012). Es traten keine „adverse events“ durch die Methode der induzierten Sputumgewinnung auf und bei allen induzierten Probanden konnte Sputum zur Analyse gewonnen werden. Für die Messung von Biomarkern wurde unsere Methode der Sputuminduktion bereits adaptiert und getestet (U. Zissler, 2012). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie gelang die Differenzierung von Leukozytensubpopulationen anhand von Oberflächenmarkern der Sputumzellen. Die Durchflusszytometrie bei

zellulären Bestandteilen des Sputums ist dabei eine relativ neue Methode mit vergleichsweise höheren technischen Schwierigkeiten als bei den mittlerweile schon in der Hämatonkologie im klinischen Alltag verwendeten Messungen im Blut oder die Zytodifferenzierung in Bronchoalveolären Lavagen (Barlogie et al., 1983; Varma & Naseem, 2011). Eine Hürde liegt beispielsweise in den schwer aufzubrechenden Schwefelbrücken, die mit DTT bzw. Sputolysin gelöst werden müssen. Das Reagenz DTT hat dabei wohl einen geringen bis keinen Einfluss auf Durchflusszytometrie und Biomarkeranalysen (Loppow, Bottcher, Gercken, Magnussen, & Jorres, 2000; U. Zissler, 2012). Um eine umfangreiche Farbpalette in induziertem Sputum zu messen, braucht man eine maximale Spezifität der Antikörperbindung. Um unspezifische Antikörperbindung durch ubiquitär exprimierte Fc-Rezeptoren und die damit einhergehende Fehlmessung zu vermeiden, wurden neutrale Antikörper (Human TrueStain FcX™) eingesetzt, welche zunächst alle Fc-Rezeptoren besetzen und somit die Bindungsspezifität der nachfolgenden Antikörper erhöhen. Trotzdem bleiben die vorbekannten Phänomene der Autofluoreszenz von Sputum zum Teil bestehen und erschweren Messung und Auswertung (Li et al., 2012). Diese Probleme konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch weitestgehend durch die Gatingstrategie sowie die Eingrenzung auf vereinzelte Zellen (Singletten) verringert werden. Ein weiteres Problem war die mangelnde Ausschöpfung der Zellzahl in der Durchflusszytometrie. Wir lasen in dieser Studie pro Sputumprobe nur maximal 50.000 Zellen aus, obwohl teilweise mehr Zellen zur Verfügung standen. Die Auswertung erfolgte jedoch mittels des prozentualen Anteils der Zellpopulation und war nicht von einer übereinstimmenden absoluten Zellzahl abhängig. Um eine erhöhte statistische Power und eine genauere Annäherung an die tatsächlichen Zellzahlen von relativ seltenen Subpopulationen zu gewährleisten wurde diese Zahl in nachfolgenden Experimenten auf 250.000 Zellen pro Probe erhöht.

Die Zytospin-Technik mit anschließender Fixierung und Färbung auf Objektträgern gelang bei allen Probanden. Durch die Verwendung von 2 Objektträgern pro Proband mit jeweils 50 µl und 100µl der vorbestimmten Zellsuspension gleicher Konzentration konnte die Notwendigkeit einer erneuten Probenentnahme geringerer oder höherer Mengen in allen Fällen umgangen werden. Bei der ersten Auszählung fiel auf, dass es gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Auszählern gab. Um die einzelnen Bereiche zurückverfolgen zu können, Gründe für Abweichungen erkennen zu können und die Inter-Auszähler-Differenz quantifizieren zu können wurde eine neues



Auszählungs-Regime eingeführt (s. Abb.7). Nach Unterteilung des Objektträgers in 4 Quadranten mittels Filzstift werden in jedem Quadrant mäanderförmig 100 Zellen ausgezählt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die gleichen Zellen gezählt werden und man für diese gleichen Bereiche evaluieren kann ob ähnlich ausgezählt wurden. Nach Auswertung der Zählung mittels der oben genannten Methode konnte gezeigt werden, dass die Inter-Auszähler-Varianz in unserer Arbeitsgruppe bei Auswertung verschiedenartiger Zytospin-Präparate bei unter 5% lag (Data not shown).

Mittels des Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assays konnten die Gesamt-Proteinkonzentrationen gemessen werden, welche auch in der Auswertung der Zytokinmessungen berücksichtigt wurden. Die MSD Multi-Array-Technologie kombiniert hohe Sensitivität mit einem einfachen und schnellen Verfahren, da plattenbasiert und simultan gemessen werden kann (Pavkovic et al., 2014). Dadurch ist bei hoher Validität und Reliabilität eine schnelle Messung möglich. Trotz einer hohen Messbreite des Verfahrens konnten abhängig vom Antigen bei zu niedrigen Konzentrationen kein Messwert angegeben werden. Dadurch musste bei manchen Proben das halbe Detektionslimit zur statistischen Auswertung herangezogen werden, das je nach Entfernung zum Median der Messgröße eine signifikante Verzerrung der Daten darstellen kann. Bei höherer Messgenauigkeit und niedrigeren Detektionslimits könnten aussagekräftigere Daten erhoben werden.

## **1.2. B-Zellen korrelieren mit lokalen Th2-Zytokinen**

Bis zum heutigen Tag wurde das Zusammenspiel von Sputum B-Zellen im Atemwegslumen mit dem Atemwegsepithel, sowie Interaktion mit anderen Immunzellen nur wenig untersucht und ist umstritten. Unser Fokus liegt dabei auf der Wechselwirkung von Th2-Zellen und B-Zellen in den oberen und unteren Atemwegen. Es gibt Studien, die eine Beteiligung der B-Zelle am allergischen Asthma bezweifeln (Hamelmann et al., 1999; Korsgren, Erjefalt, Korsgren, Sundler, & Persson, 1997). Kidney et al. wiesen jedoch eine signifikant erhöhte Anzahl an B-Zellen bei Asthmatikern mittels Durchflusszytometrie im Sputum nach (Kidney et al.,

1996). Außerdem wurden bei allergischen Asthmatikern erhöhte B-Zell-Aktivierungs-Cytokine wie z.B. BAFF im Sputum gemessen (Jee et al., 2010) und legen eine tiefe Verstrickung der B-Zelle mit der Pathogenese von Asthma nahe. Abgesehen von der zentralen Aufgabe der IgE-Produktion nach Th2-Stimulation ist die Rolle von B-Zellen jedoch relativ unerforscht und kann weitere Aspekte in der allergischen Entzündung liefern. Lindell et al. fanden eine verstärkende Wirkung auf das Th2-Milieu bei chronischen allergischen Atemwegserkrankungen, die möglicherweise auf einer Antigenpräsentation durch B-Zellen beruht (Lindell et al., 2008). Wir konnten in unserer Studie, wie bereits von Kidney et al. beschrieben, eine erhöhte Anzahl an CD19-positiven B-Zellen im Sputum von allergischen Asthmatikern „in season“ gegenüber „out of season“ und der Kontrollgruppe (Abb. 19) nachvollziehen (Kidney et al., 1996).

Th2-Zytokine, darunter vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 haben einen erheblichen Einfluss auf Aktivierung und Funktion der B-Zelle. IL-5 und IL-13 befördern eine Proliferation und Differenzierung der B-Zelle, die dann als Plasmazelle Antikörper produziert (Romagnani, 2002). Durch den Einfluss von IL-4 und IL-13 wiederum vollzieht sich ein Antikörper-Klassenwechsel zu IgG und vor allem IgE-Subtypen, die nicht primär von Plasmazellen produziert werden (Del Prete et al., 1988; Romagnani, 2002). IL-13 steht hierbei im Mittelpunkt und ist in mehrfacher Funktion für die erhöhte bis übermäßige Produktion von IgE verantwortlich (Cocks, de Waal Malefyt, Galizzi, de Vries, & Aversa, 1993; Wills-Karp et al., 1998). Im Nasensekret sowie im Sputum fand sich ein signifikanter Anstieg der IL-13-Spiegel bei Asthmatikern „in season“ im Vergleich zu Asthmatikern „out of season“ (Abb. 24). Mamessier et al. konnten bereits zeigen, dass bei einer Exposition mit dem Allergen im Rahmen einer SIT vermehrt IL-13 produzierende T-Helferzellen im induzierten Sputum vorkommen (Mamessier et al., 2007). Hieran zeigt sich die verstärkte Th2-Antwort, die im Rahmen der allergischen Reaktion hervorgerufen wird. Auch für IL-4 ließ sich ein Anstieg „in season“ nachweisen, der nur im nasalen Sekret signifikant war (Abb. 24). Diese Ergebnisse decken sich mit einer Studie von Olivenstein et al., die eine erhöhte Anzahl von IL-4-mRNA-exprimierenden Zellen im induzierten Sputum von Asthmatikern fanden (Olivenstein, Taha, Minshall, & Hamid, 1999). Wir konnten zudem grafisch und statistisch darlegen, dass trotz relativ niedriger IL-4- und IL-13-Spiegel bei Asthmatikern „out of season“ diese in fast allen Fällen zur Graspollensaison hin wieder signifikant anstiegen (Abb.25). Es konnte sogar eine

Korrelation von B-Zell-Frequenz im Sputum und IL-13 im Sputum gezeigt werden (Abb.36). Dies legt eine Wechselwirkung der B-Zelle mit IL-13 in den lokalen Sekreten nahe.

Damit fügen sich unsere Messungen gut in das Bild einer Th2-getriebenen Entzündung bei Asthma ein. Dass der Anstieg bei den Th2-Zytokinen zur Pollensaison nicht immer signifikant war, lässt sich zum einen mit der geringen Fallzahl und der direkt daraus resultierenden mangelnden statistischen Power (z.B. in der Gruppe Asthma „out of season“: n=12) erklären. Zum anderen ist durch Schwefelbrücken, Verunreinigungen und chemische Zusätze wie DTT in Zusammenspiel mit geringen Konzentrationen der Zytokine die Messung, insbesondere im Sputum, möglich aber erschwert (Li et al., 2012).

Auf den ersten Blick widersprüchlich war die Höhe der Th2-Zytokin-Spiegel bei den Kontrollprobanden, der teilweise höher als bei den Asthmatikergruppen war. So war im Nasensekret IL-4 (Abb.24) und IL-17 (Abb.26) bei Asthmatikern „out of season“ im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Selbiges galt für IL-13 im Sputum (Abb.24). Auf der Grundlage der Th2-Hypothese hätte man außerhalb der Allergenexposition gleiche oder höhere Werte erwarten können. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich jedoch auch bei Arbeitsgruppen, die unter physiologischen Bedingungen erniedrigte Spiegel von IL-13 und IL-4 im Nasensekret von Probanden mit Rhinokonjunktivitis messen konnten (Baumann et al., 2013; König et al., 2015). Im Sputum wurde eine solche Befundkonstellation bei Asthmatikern unseres Wissens nach noch nicht gezeigt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Wirkung dieser proinflammatorischen Zytokine in hohem Maße von der Rezeptordichte der Effektorzelle abhängt. Damit wäre beispielsweise eine stärkere Immunantwort eines Asthmatikers mit hochregulierten Rezeptoren bei einem Zytokinspiegel auf Höhe eines gesunden Kontrollprobanden möglich.

Die von B-Zellen produzierten Antikörper können zum einen körperfremde Antigene binden und opsonieren, zum anderen werden diese jedoch auch auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden. Sie führen bei Antigenkontakt zu einer Degranulation der Mastzelle bei Bindung des spezifischen Antigens und spielen somit eine zentrale Rolle bei atopischen Erkrankungen. Außerdem können Antikörper von weiteren Zellen wie beispielsweise der NK-Zelle über den FcγRIII-Rezeptor gebunden werden und bei Antigen-Kontakt diese Zellen aktivieren. Die alleinige Herstellung von

Antikörpern kann aber die Gesamtfunktion von B-Zellen in der Pathogenese von Asthma nicht zusammenfassen. So konnten bei knock-out-Mäusen ohne Mastzellen Aspekte von allergischen Reaktionen der Lunge trotz fehlender Mastzelldegranulation gezeigt werden (Williams & Galli, 2000). Aber auch eine polarisierende, sezernierende Funktion von B-Effektor-Zellen (Be1 und Be2) mit Beeinflussung der T-Zell-Differenzierung konnte von Harris et al. beschrieben werden. (Harris et al., 2000) Unter dem Einfluss von Th2-Zellen und des IL-4/IL-4R Signalwegs differenzieren dabei naive B-Zellen zu Be2- Zellen, welche wiederum selbst Th2-zytokine ausschütten (Harris, Goodrich, Mohrs, Mohrs, & Lund, 2005). Dass es auch B-regulatorische Zellen gibt, die mit Hilfe der Ausschüttung von beispielsweise IL-10 sogar anti-inflammatorische Funktionen übernehmen, konnte in Mäusen gezeigt werden (Hussaarts, van der Vlugt, Yazdanbakhsh, & Smits, 2011; Matsushita & Tedder, 2011). Auch beim Menschen wurde eine Subpopulation IL-10-produzierender B-Zellen gefunden (Matsumoto et al., 2014). Die von uns gefundene Korrelation von B-Zellen und IL-10 (Abb. 37) könnte demnach darauf hinweisen, dass sich in unserer CD19-positiven B-Zell-Population ein Anteil an regulatorischen B-Zellen befindet, der für die IL-10-Ausschüttung mitverantwortlich ist. Dabei unterdrücken Bregs vor allem die Proliferation und Differenzierung von CD4+-T-Zellen (van de Veen et al., 2013). Der von Bregs induzierte Antikörper-Klassenwechsel von IgE zu IgG<sub>4</sub> scheint außerdem ein Schlüsselmechanismus der AIT-Therapie zu sein (van de Veen et al., 2016).

Wie oben beschrieben, interagieren die Th2-Zytokine mit B-Zellen im Sputum. In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die IL-13- und IL-24-Spiegel mit der Häufigkeit von CD19-positiven B-Zellen im Sputum positiv korrelieren und für IL-13 dem bisherigen Verständnis der Wechselwirkung von Th2-Mediatoren und B-Zellen entsprechen (Abb. 36). Für IL-24 sind die Zusammenhänge zur B-Zell-Frequenz im Sputum noch nicht bekannt. Es ist ein Interleukin aus der IL-10-Familie und trat zum ersten Mal unter dem Namen „melanoma differentiation associated gene-7“ oder kurz „mda-7“ als Tumorsuppressor bei der Melanomdifferenzierung in Erscheinung. IL-24 wird aber auch von Epithelzellen, Th2-Zellen und Monozyten gebildet (Commins, Steinke, & Borish, 2008; U. M. Zissler, Esser-von Bieren, et al., 2016). Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer bereits veröffentlichten Publikation zeigen, dass IL-24 im Antagonismus zwischen Th1 (IFN- $\gamma$ ) und Th2 (IL-4) von Bronchialepithelzellen unter dem Einfluss von IL-4 und unabhängig von IFN- $\gamma$  induziert wird (U. M. Zissler,

Chaker, et al., 2016). Caudell et al., die mda-7/IL-24 als Interleukin postulierten, fanden in gesorteten CD19-positiven B-Zellen und CD56-positiven NK-Zellen aus PBMCs in humanen Tonsillen eine erhöhte Expressierung von IL-24 per Immunhistochemie (Caudell et al., 2002). Die Membranexpressierung war dabei auf den CD56-positiven NK-Zellen am stärksten, das granuläre Vorkommen jedoch in beiden Zellpopulationen vorhanden. Wir konnten nun den Zusammenhang durch die positive Korrelation von B-Zellen (Abb.36) und NK-Zellen (Abb.34) mit IL-24 auch im nasalen Sekret von Allergikern bestätigen. Außerdem zeigten sich signifikant erhöhte IL-24-Spiegel im Sputum und im nasalen Sekret von Asthmatikern in season (Abb.29).

Die Rolle von IL-24 in der Pathophysiologie von Asthma generell und ob es in der Pathophysiologie pro-, oder anti-inflammatorisch agiert, ist laut vorliegender Literatur nicht hinreichend untersucht. Einerseits korrelieren in unserer Studie der Quaddeldurchmesser im Pricktest und IL-24 im nasalen Sekret, womit eher eine pro-inflammatorische Th2-Wirkung untermauert würde. Im Blut konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-24 die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen inhibiert (Maarof et al., 2010). Über eine verminderte Antikörperkonzentration wäre somit ein anti-inflammatorischer Effekt denkbar. In unserer Studie konnten aufgrund des FACS-Staining-Panels keine Plasmazellen identifiziert werden um diese Aussage für das Sputum zu überprüfen. Auch über die Wirkung von IL-24 an IL-10-Rezeptoren könnte eine anti-inflammatorische Wirkung resultieren (Commins et al., 2008). Die Erhöhung des IL-24-Spiegels bei allergischen Asthmatikern wäre damit möglicherweise doch eher Folge einer antiinflammatorischen Gegenregulation. Eine mechanistische Studie könnte hier Aufschluss über die Wirkung von IL-24 geben.

An dieser Stelle soll noch auf das Th1-Zytokin Interferon-gamma eingegangen werden, welches in unserer Studie im nasalen Sekret einen signifikanten Anstieg von „out of season“ zu „in season“ zeigte. Grundlegend könnte man davon ausgehen, dass IFN- $\gamma$  im bekannten Antagonismus von Th1- und Th2-Zytokinen bei Allergikern lokal zurückgeht oder maximal gleichbleibt. Bereits Mamessier et al. konnten einen Anstieg der IFN- $\gamma$  -Konzentration nach Allergenexposition im induziertem Sputum bei berufsbedingten Asthmatikern messen (Mamessier et al., 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Th1-Reaktion nicht unbedingt Th2-getriggerte Allergien verbessert, sondern verstärken kann (Hansen, Berry, DeKruyff, & Umetsu, 1999;

Randolph, Stephens, Carruthers, & Chaplin, 1999; U. M. Zissler, Chaker, et al., 2016). Dies legt die Hypothese nahe, dass bei der Pathogenese weniger das Gleichgewicht von Th1/Th2-Zellen gestört ist, sondern Th1- und Th2-Populationen die Anzahl der T-regulatorischen Zellen vermindern (Karagiannidis et al., 2004).

Nachdem es sich hier vor allem um Asthmatiker handelte, die teils mehr, teils weniger Probleme mit Rhinokonjunktivitis hatten, ist zu beachten, dass unterschiedlich exponierte Epithelien verschieden reagieren. In der Nase findet vor allem der Antigenkontakt statt, die Reaktion in der Lunge erfolgt eher durch die sekundär initiierte Inflammation. Ein möglicher Aspekt ist, dass auf Gräserpollen gramnegative sowie gram-positive Bakterien (vor allem vom Typ Bacillus) gefunden wurden und daraufhin ein IFN- $\gamma$ -Anstieg messbar war (Heydenreich et al., 2012). Abschließend ist außerdem möglich, dass beim Messzeitpunkt in der „Grippe-Saison“ im Herbst und Winter, trotz Probandenausschluss bei „Erkältungssymptomen“, mehr subakut infizierte Probanden in der relativ kleinen Kontrollgruppe waren und somit das Ergebnis verfälschten. Dies offenbart ein Defizit im Studiendesign bei dem die Kontrollen aus organisatorischen Gründen nur außerhalb der Pollensaison gemessen werden konnten. Wir empfehlen die Kontrolle der Daten in einer Studie mit Messung der Kontrollprobanden zu den Zeitpunkten „in season“ und „out of season“ und mit einer höheren Probandenzahl.

Andersherum fiel IL-33, das mechanistisch als primär epithelial sezernierter Baustein der Th2-Reaktion beim allergischen Asthma gilt, im Nasensekret beider Asthmatikergruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Im Sputum hingegen waren die „in season“-Spiegel leicht und die „out of season“-Spiegel stark, wenn auch nicht signifikant, oberhalb der Kontrolle. IL-33 wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht aber könnte im Zusammenhang mit einer beschriebenen physiologischen Unterdrückung der Adhäsionsfaktoren ICAM-3 und Selectin (Rogala & Gluck, 2013) durch erniedrigte Spiegel lokal inflammatorisch wirken. Vielleicht sind es aber auch Verbrauchsphänomene, die IL-33 im lokalen Sekret von Asthmatikern erniedrigten.

## 1.3. NK-Zellen korrelieren mit lokalen Th2-Zytokinen und Eosinophilie

Wir konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie erstmalig zeigen, dass  $CD56^+CD3^-$  - NK-Zellen im Sputum bei Asthmatikern „in season“ gegenüber Asthmatikern „out of season“ signifikant erhöht sind (Abb.19). Dies legt eine Beteiligung des innate Immunsystems bei der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale nahe. Es lässt sich außerdem mit Studien, die NK-Zellen eine zentrale Rolle in der Kontaktdermatitis zuteilt, in Einklang bringen (Carbone et al., 2010). Da es sich bei der Kontaktdermatitis um eine Allergie im Rahmen einer Typ-IV-Reaktion handelt, ist hier im Unterschied jedoch kein IgE am Pathomechanismus beteiligt.

In unserer Studie korrelierten die NK-Zellen auch klinisch mit der Höhe der Sx1-Immunocap-Antikörper im Serum (Abb.21) und Quaddeldurchmesser beim Gräser-Pricktest auf der Haut (Abb.21). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde schon von Kusaka et al. gefunden, die jedoch den Zusammenhang zwischen Gesamt-IgE und NK-Zell-Aktivität ausschließlich bei Gesunden untersuchten und dort ebenfalls eine positive Korrelation fanden (Kusaka et al., 1997). Einen möglichen molekularbiologischen Zusammenhang zur Höhe des Antikörperspiegels bildet der von NK-Zellen exprimierte FcγRIII-Rezeptor (CD16). Er erkennt von Plasmazellen gebildete Antikörper und führt zur Aktivierung der Killerzelle, die sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität (Moretta et al., 2001). Je mehr Plasmazellen vorhanden sind, desto mehr Antikörper wie IgE oder IgG werden gebildet und umso aktiver und zahlreicher sind möglicherweise die NK-Zellen im lokalen Sekret. Da in der vorliegenden Studie keine Färbung für CD16 vorgenommen wurde kann an dieser Stelle nur gemutmaßt werden.

NK-Zellen im Sputum korrelierten in unserer Studie positiv mit nasalem IL-24 (Abb.34). Es konnte in Studien bereits eine Produktion von IL-24 durch NK-Zellen nachgewiesen werden (Caudell et al., 2002). IL-24 ist damit ein Bindeglied in der Orchestrierung von innate und erworbenem Immunsystem.

Mit Hilfe von NK-Zell-knockout-Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen einen zentralen Einfluss auf die Eosinophilie und die Th2-Zytokinproduktion

haben und teilweise selbst Th2-Zytokine produzieren (Mathias et al., 2014). Nachgewiesen ist beispielsweise die Produktion von IL-5 durch NK-Zellen bei Mäusen in vivo (Walker, Checkel, Cammisuli, Leibson, & Gleich, 1998). Sie interagieren über dieses zentrale Th2-Zytokin nicht nur mit weiteren NK-Zellen, sondern auch mit einem weiteren zentralen Mitspieler im allergischen Asthma, den eosinophilen Granulozyten (Korsgren et al., 1999).

Bei der vorliegenden Studie konnten erhöhte Zellzahlen an Eosinophilen bei beiden Asthmatikergruppen im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abb.17). Die Eosinophilie ist beim allergischen Asthma ein entscheidender pathogenetischer Faktor, kann aber auch bei allergischer Rhinitis nachgewiesen werden (Fahy, 2009). Zum einen ist bekannt, dass Exazerbationen und somit die Asthma-Kontrolle mit der Anzahl der Sputum-Eosinophilen zusammenhängen (Jatakanon, Lim, & Barnes, 2000). Zum anderen konnte ein Absinken der Eosinophilenzahlen bei oraler Kortisontherapie gezeigt werden (Djukanovic et al., 1997). Dabei wird die Rolle der Eosinophilen auch durch die Entdeckung des Neutrophilen-Asthma relativiert (Douwes, Gibson, Pekkanen, & Pearce, 2002).

Ein weiterentwickelter, molekularbiologischer Ansatz postuliert, dass die Eosinophilen/Neutrophilen-Asthma-Unterscheidung besser durch Th2-low/Th2-high-Subtypen beschrieben und im Alltag ersetzt werden kann (Woodruff et al., 2009). Diese beiden Gruppen zeigten dabei Unterschiede bei IL-13- und IL-5 Spiegel, Eosinophilie, Gesamt-IgE, subepithelialer Fibrosierung, Mucinproduktion und Ansprechen auf inhalative Kortikosteroide. Den Zusammenhang zwischen Th2-Zytokinen und Eosinophilen kann unsere Studie unterstreichen, da IL-5 im Sputum und Eosinophile im Sputum miteinander korrelieren und über IL-5 als Bindeglied die Wechselwirkung zwischen Eosinophilen, NK-Zellen sowie T- und B-Zellen erklären. Die Wechselwirkung zwischen T-Helferzelle und eosinophilem Granulozyt ist in der Literatur als reziprok beschrieben, eine Aktivierung von Eosinophilen durch IL-5-produzierende NK-Zellen ist jedoch ebenfalls bekannt (Harris et al., 2000). Ob es sich um einen Th2-low oder Th2-high-Typ handelt, könnte dabei über die klinische Analyse von lokalen Atemwegssekreten erfolgen und dabei wichtige Therapieentscheidungen unterstützen.

Ein klinisches Einsatzgebiet, welches in die Wechselwirkung von T-Helfer-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Eosinophilen eingreift, ist der Anti-IL-5-Antikörper



"Mepolizumab", der in Deutschland seit 2016 für nicht-allergisches, eosinophiles Asthma zugelassen ist. Eine Cochrane Metaanalyse aus 2015 zeigt Hinweise auf einen klinischen Benefit, ist aber aufgrund widersprüchlicher Daten verhalten optimistisch und empfiehlt weitere Studien (Powell, Milan, Dwan, Bax, & Walters, 2015). Für allergisches Asthma ist die Therapieempfehlung im Bereich der „Biologicals“ für therapierefraktäres Asthma aber weiterhin Omalizumab, ein Anti-IgE-Antikörper. Dessen Effektivität gegenüber Placebo wurde bei Asthma im Erwachsenenalter in einer Cochrane-Metaanalyse bei über 10 Jahren klinischer Erfahrung positiv bewertet (Normansell, Walker, Milan, Walters, & Nair, 2014).

## 1.4. Regulatorische T-Zellen im Sputum

T-regulatorische Zellen sind immunregulatorische Subtypen der T-Zelle, die andere Immunzellen inhibitorisch beeinflussen können. Der TNF-Rezeptor GITR, aber vor allem FOXP3 sind spezifisch für  $CD4^+CD25^+$ -Zellen und können somit deren Detektion vereinfachen (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003; Shimizu, Yamazaki, Takahashi, Ishida, & Sakaguchi, 2002). Dabei wurde von Yu et al. im Blut gezeigt, dass die am stärksten FOXP3-positive Population durch die Oberflächeneigenschaften als  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$  charakterisiert werden kann (Yu et al., 2012). Ausgehend von der Annahme, dass sich in dieser Population zumindest viele stark FOXP3-positive Zellen befinden, wurde in unserer Studie auf die Färbung des intrazellulären Markers FOXP3 verzichtet. Dies wurde schon von Nguyen et al. durchgeführt und führte zu neuen Erkenntnissen in der Interaktion von dendritischen Zellen mit T-regulatorischen Zellen (Nguyen, Vanichsarn, & Nadeau, 2009).

In unserer Studie zeigte sich eine Dysbalance der  $CD4^+CD25^+CD127^-$  -Tregs mit signifikant verminderten Zellzahlen im Sputum von Asthmatikern (Abb.19). Ausgehend von Yu et al. (Yu et al., 2012) sind somit weniger T-regulatorische Zellen mit hochexprimiertem FOXP3 in deren Atemwegssekret. Auch Mamessier et al. stellten fest, dass nach SIT/Allergenexposition bei berufsbedingten Asthmatikern eine verminderte Anzahl an T-regulatorischen Zellen im induzierten Sputum

vorzufinden war (Mamessier et al., 2007). In vorangehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass IL-10 produzierende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen die Inflammation verringern (Hadeiba & Locksley, 2003). Einen Einfluss auf die für Asthma typische Atemwegshyperreagibilität haben diese Zellen aber laut Hadeiba und Locksley nicht.

Die allergische Belastung scheint mit abnehmender Treg-Zahl zuzunehmen und betont die Wichtigkeit der Balance aus pro- und anti-inflammatorischen Immunzellen und deren Zytokinen. Ein bisher noch nicht gezeigter Zusammenhang ist die negative Korrelation von Periostin im Sputum mit der Populationsgröße der regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) im Sputum (Abb.32). Periostin wird, durch IL-13 induziert, von bronchialen Epithelzellen gebildet (Woodruff et al., 2007). Bei einer Aktivierung mittels IL-13 kann es durch von Fibroblasten gebildetes Periostin zu einer subepithelialen Fibrosierung mit Remodeling der Atemwege und Langzeitschäden kommen (Sidhu et al., 2010; Takayama et al., 2006). Möglicherweise spielen regulatorische T-Zellen auch mehr oder weniger direkt bei der Inhibition des Lungenbaus eine Rolle. Periostin ist zuletzt als Marker des Endotyps mit eosinophiler Inflammation bei allergischen Asthmatikern entdeckt worden (Bobolea et al., 2015) und zeigt nun in unserer Studie auch eine Verstrickung in regulatorische Funktionen.

Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Tregs könnten eine Rolle in der Hyposensibilisierungsreaktion spielen. Francis et al. beschreiben eine erhöhte Anzahl an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> -Zellen in PBMCs nach Th2-Stimulation bei Bienenallergikern nach einem Jahr spezifischer Immuntherapie (SIT) im Vergleich zu Bienenallergikern ohne SIT (Francis, Till, & Durham, 2003). Allerdings wurde in dieser Studie weder FOXP3 noch CD127 gefärbt und die Daten erlauben damit keine endgültige Aussage, ob es sich hier nicht doch einfach um aktivierte T-Zellen handelte. In neueren Studien konnte eine eindeutige Identifizierung einer erhöhten FOXP3-positiven Treg-Population nach SIT mit Gräserpollenallergen in der nasalen Schleimhaut gefunden werden (Radulovic, Jacobson, Durham, & Nouri-Aria, 2008).

Auch das IL-4 induzierte Zytokin IL-24 im Sputum (U. M. Zissler, Chaker, et al., 2016) zeigte eine negative Korrelation mit den Tregs (Abb.32). Dies legt nahe, dass T-regulatorische Zellen das Th2-Milieu auch im Sputum inhibieren und somit lokal anti-inflammatorisch wirken. Die einzige Studie, die in eine ähnliche Richtung weist, ist aus dem Jahr 2014. In Speicheldrüsenbiopsien von Sjögren-Syndrom-Patienten

finden sich erniedrigte Spiegel von IL-24 bei erhöhter Anzahl an T-regulatorischen Zellen (Furuzawa-Carballeda et al., 2014). Ob es einen direkten mechanistischen Zusammenhang zwischen T-regulatorischen Zellen und IL-24 gibt bleibt zu erforschen.

Eine anti-inflammatorische Rolle der T-regulatorischen Zelle wird durch die negative Korrelation der T-regulatorischen Zellen mit den, für die asthmatische Entzündung zentralen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in unserer Studie bestätigt (Abb.20). Die negative Korrelation von Eosinophilen mit Tregs wurde bereits für PBMCs von Atopikern (Orihara et al., 2007), aber nicht in lokalen Atemwegssekreten von Asthmatikern gezeigt. Auch die inhibitorische Funktion von Tregs auf Neutrophile wurde bereits in Tumoren (Richards et al., 2010) aber auch in einem Asthma-Modell nachgewiesen (Park et al., 2016). T-regulatorische Zellen scheinen somit einen inhibitorischen Effekt sowohl auf die Anzahl der proinflammatorischen Granulozyten bei Neutrophilen-, als auch Eosinophilen-Asthma zu besitzen.

Die negative Korrelation der Tregs zu Quaddeldurchmesser im Gräser-Pricktest sowie der Lebensqualität beleuchtet deren Spektrum an regulatorischen Funktion (Abb.22). Gerade die Antikörperproduktion von IgE allgemein aber auch mit den Aeroallergen-spezifischen IgE (Sx1) im speziellen korrelierte stark negativ mit der Anzahl der T-regulatorischen T-Zellen im Sputum (Abb.22). Für PBMCs konnte auch dieser Zusammenhang bereits von Orihara et al. gezeigt werden (Orihara et al., 2007). Eine Studie bei Probanden mit atopischer Dermatitis wies einen ähnlichen Zusammenhang über eine positive Korrelation des Th17-Zell/Treg-Zell-ratios im Blut zum Gesamt-IgE-Spiegel im Blut bei einer größeren Kohorte nach (Ma et al., 2014). Bereits länger bekannt ist, dass bei der Pathogenese von allergischem Asthma T-regulatorische Zellen über eine Inhibition von B-Zellen einen verminderten IgE-Spiegel hervorrufen (Braga et al., 2011). Es gibt zudem Hinweise, dass die Autoantikörperproduktion bei Autoimmunerkrankungen stark mit einem Mangel an T-regulatorischen Zellen vergesellschaftet ist (Leonardo, De Santis, Gehrand, Malherbe, & Gauld, 2012). Dies ist auch mit einer veränderten B-Zell-Entwicklung und Aktivität bei Mangel an T-regulatorischen Zellen vereinbar (Leonardo, Josephson, Hartog, & Gauld, 2010). Eine von Bach postulierte Hypothese besagt, dass die T-regulatorische Zellen für den Anstieg der Autoimmunkrankheiten und Allergien der letzten Jahrzehnte verantwortlich sein könnten (Bach, 2002).

## 1.5. Die klinischen Aspekte der saisonalen allergischen Asthmatiker

Erstmals wurde in unserer Studie mittels zweier Fragebögen bei saisonalen allergischen Asthmatikern und Kontrollen sowohl Lebensqualität im RQLQ (Rhinocconjunctivitis Quality of Life Questionnaire) als auch psychischer Stress im PSQ (Perceived Stress Questionnaire) der Probanden abgefragt. Dabei zeigte sich, dass die Beeinträchtigung der Lebensqualität von Asthmatikern „in season“ über „out of season“ zu den Kontrollprobanden hin signifikant abnahm (Abb.11). Ebenso wurde nachgewiesen, dass der wahrgenommene Stress in entgegengesetzter Richtung zunahm (Abb.12). Die Beeinträchtigung der Lebensqualität und der psychische Stress korrelierten positiv und wiesen auf einen Zusammenhang hin (Abb.13). Von allen Unterkategorien der Lebensqualität zeigten vor allem Einschränkungen in der Aktivität der Probanden einen besonders starken Zusammenhang mit dem erlebten Stress (Abb.15). In dieser Studie wurde nach unserem Wissensstand erstmals der PSQ bei allergischen Erkrankungen eingesetzt, der ein valides Instrument zur Evaluierung eines Teilbereichs der menschlichen Psyche darstellt und eventuell zusätzlich zur Lebensqualität in klinischen Studien eingesetzt werden könnte. Dabei wurde der PSQ für das Gebiet Psychosomatik von Herbert Fliege im Jahr 2001 erstellt und bereits in großen klinischen Studien validiert. Eine Besonderheit ist seine Gewichtung einzelner Teilbereiche des Stress' um ein objektiveres Gesamtbild des transaktionalen Stress' zu erzeugen (Fliege et al., 2005; Kocalevent et al., 2007). Der RQLQ wurde bereits 1991 als Instrument zur Messung der Lebensqualität bei Rhinokonjunktivitis erstellt (Juniper & Guyatt, 1991). Dabei wird er heutzutage auch aufgrund der langen klinischen Erfahrung unter anderem zur Evaluierung des Therapieerfolgs bei SIT verwendet. Zu kritisieren wäre die Benutzung des RQLQ, da es sich in unserer Studie primär um allergische Asthmatiker und deren Symptome handelt. Man hätte den ebenfalls standardisierten und validierten Asthma Quality of Life Questionnaire (AQLQ) verwenden können, der noch spezifischer auf die Lebensqualität von Asthmatikern eingeht (Juniper et al., 1992). Andererseits bestand bei den teilnehmenden allergischen Probanden eine große Komorbidität mit

allergischer Rhinitis und es konnten eindeutige Unterschiede bezüglich der Lebensqualität gemessen werden. Interessant wäre auch die Einbeziehung der erlebten Asthma-Kontrolle (PACQ) im Vergleich zum objektiven GINA-Score, dem RQLQ bzw. AQLQ, dem PSQ aber auch molekularbiologischen Untersuchungen (Katz, Yelin, Eisner, & Blanc, 2002).

Einen in dieser Form nicht gezeigten Zusammenhang brachte die statistische Korrelation von GINA-Asthma-Kontrollgrad mit dem Gesamtwert des PSQ als auch des RQLQ (Abb.14). Aber auch auf zellulärer Ebene konnten wir eine negative Korrelation von Lebensqualität und eosinophilen sowie neutrophilen Granulozyten nachweisen (Abb.18). Unkontrolliertes Asthma geht mit höherem Stressempfinden und einer geringeren Lebensqualität einher. Bisher bekannt ist einerseits eine Komorbidität mit psychiatrischen Erkrankungen (Goodwin et al., 2003). Andererseits gibt es die Hypothese, dass durch Stress eine Suppression der Hypophyse einen Mangel an körpereigenem Kortisol hervorruft und damit zumindest einen proinflammatorischen Beitrag zur Genese von Asthma liefern kann (Di Marco, Santus, & Centanni, 2011). Ouellet et al. beschreiben eine verminderte Asthmakontrolle durch Stress (Ouellet et al., 2012). Die Beziehung zwischen Asthma und Stress ist für unser Verständnis eher reziprok mit einer Erhöhung des Stresslevels durch unkontrolliertes Asthma und umgekehrt. Die Verwendung des PSQ ist in diesem Zusammenhang ein neues Messinstrument, das wohl den Asthmakontrollgrad zu einem gewissen Grad widerspiegeln kann. Generell sollte im klinischen Gesamtkonzept der Asthmathherapie besonders bei schweren Fällen eine psychologische oder psychosomatische Mitbetreuung und Anbindung mitbedacht werden.

Eotaxin-3 (CCL 26) wurde in einer vorangehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe schon als IL-4 induzierbares, pro-inflammatorisches Zytokin bei allergischer Rhinitis beschrieben (U. M. Zissler, Chaker, et al., 2016). Im Sputum korrelierte Eotaxin-3 in dieser Studie positiv mit Gesamt-IgE, Sx1-Antikörpern, Gräser-Pricktest und Birken-Pricktest (Abb.31). Diese erstaunliche Verknüpfung mit allen von uns gemessenen allergiediagnostischen Parametern offenbart einen essentiellen Angelpunkt der Allergie. Wahrscheinlich über die chemotaktische Beziehung zu eosinophilen Granulozyten (Ravensberg et al., 2005) ist die allergische Reaktion abhängig von Eotaxin-3. Die Wechselwirkung von eosinophilen Granulozyten mit B-Zellen

wiederum könnte verantwortlich für eine gesteigerte Antikörperproduktion sein, die sich in erhöhtem Gesamt-IgE und Sx1-Antikörpern ausdrückt.

Mittels ROC-Analyse konnten wir die Fähigkeit der gemessenen Biomarker ermitteln zwischen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern zu unterscheiden. Dabei zeigten Periostin im Sputum (AUC=0,76) und G-CSF im nasalen Sekret (AUC=0,78) unter allen Biomarkern die höchste Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung dieser 2 Gruppen. Mehrere Studien zur Validierung von Serum-Periostin als Biomarker für Eosinophilie und Asthma wurden bereits durchgeführt, (Jia et al., 2012) jedoch konnten wir nachweisen, dass mit Sputum-Periostin auch lokale Zytokine relevante Biomarker für den Krankheitsverlauf sein könnten. Außerdem konnten wir mittels ROC-Analyse zeigen, dass IL-24 bei einer AUC=0,91 ein gutes Instrument ist um kontrollierte Asthmatiker (GINA-Score=0) von teils und ganz unkontrollierten Asthmatikern (GINA-Score<0) zu unterscheiden. Ein Zusammenhang von IL-24 und Asthmakontrollgrad ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Möglicherweise könnte IL-24 ein Verlaufsmarker, ähnlich dem HbA1c in der Verlaufsbeurteilung des Diabetes mellitus, mit objektivierbarer Aussage zum Verlauf des allergischen Asthmas bzw. des Entzündungszustandes sein.

IL-24 und IL-13 korrelieren jeweils in Sputum und nasalem Sekret stark positiv. Das Verständnis, dass nicht nur eine räumliche, sondern auch eine immunologische Verbindung zwischen den oberen und unteren Atemwegen besteht ist spätestens seit der „United Airways“-Hypothese von Braunstahl et al. bekannt (Braunstahl, 2007). Der genaue Mechanismus wird diskutiert, man geht jedoch von einer Beteiligung von Adhäsionsfaktoren bei der Entstehung der generalisierten Entzündung aus (Braunstahl et al., 2001). Der Zusammenhang über systemische Zytokine wurde ebenfalls postuliert aber nicht abschließend erforscht. Da unsere Messungen lediglich die lokalen Sekrete betraf kann in unserer Studie nichts über einen systemischen Link der beiden Atemwegsabschnitte ausgesagt werden. Andererseits könnte die Theorie der Mikroaspiration eine größere Rolle spielen, wenn lokale Biomarker des Nasensekrets in die Lunge gelangen und dort eventuell eine Entzündungskaskade anstoßen. Unsere Messungen der beiden Sekrete waren nicht in ausreichendem Maß übereinstimmend um von einer Messung der oberen Atemwege etwas über die unteren Atemwege aussagen zu können. Man sollte jedoch gerade diesen Zusammenhang erforschen, um in naher Zukunft über das

relativ leicht und wenig invasiv zu gewinnende Nasensekret Rückschlüsse auf die Inflammation in der Lunge ziehen zu können.

Insgesamt konnten wir mit dieser Studie ein Muster der lokalen Entzündung der Atemwege bei allergischem Asthma erstellen. Dabei zeigten sich vor allem die Frequenz an B-Zellen, T-regulatorische Zellen und NK-Zellen deutlich verändert. Die gemessenen Biomarker zeigten ein spezifisches Muster bei Asthmatikern und spiegelten die Th2-Entzündung wider. So könnten lokale Biomarker, darunter G-CSF und Periostin, bei der Diagnosestellung des heterogenen Krankheitsbildes „Asthma bronchiale“ in Zukunft eine Rolle spielen. Auch ob lokale Biomarker, wie IL-24, zur Verlaufsmessung des Asthma-Kontrollgrads geeignet sind sollte in klinischen Studien weiter überprüft werden.

# 6 Anhang

## 6.1 Einschlusskriterien

### Ein- und Ausschlusskriterien der Studie im Rahmen der Dissertation von Moritz Ulrich

#### **Einschlusskriterien „Allergische Asthmatiker“ aus UBA-Studie:**

- a. *Mindestens 2 der im folgenden genannten Symptome der oberen Atemwege, die auf eine allergologische Erkrankung hindeuten: Niesen, Juckreiz, Naselaufen, Augenjucken, verstopfte Nase, retronasaler Schleimfluss, Husten, Asthmaanfälle, Infektneigung, saisonale Häufung der Beschwerden.*
- b. *Alter zwischen 20 und 65 Jahren.*
- c. *Die Patientin / der Patient muss seinen Hauptwohnsitz seit mindestens 20 Jahren in der jeweiligen Region (Nordrhein-Westfalen, bzw. Bayern) haben.*
- d. *Einverständnis gemäß Einverständniserklärung ( siehe Anlage).*

#### **Zusätzliches Einschlusskriterium in dieser Studie:**

- e. *vordiagnostiziertes Asthma*

#### **Ausschlusskriterien „Allergische Asthmatiker“ aus UBA-Studie:**

1. *Anamnestisch bekannte oder aktuelle psychische Erkrankung oder Störung, die die Fähigkeit der Patienten beeinträchtigen kann, die Anforderungen der Prüfung zu verstehen, an der Prüfung teilzunehmen oder die Einwilligung nach Aufklärung zu geben.*
2. *Anamnestisch bekannte(r) oder aktuelle(r) Abhängigkeit oder Mißbrauch von Alkohol oder Medikamenten.*
3. *Einnahme von langwirkenden Antihistaminika in den letzten 72 Stunden und/oder Einnahme von systemischen Glukokortikoiden in den letzten 7 Tagen und/oder Einnahme von Immunsuppressiva.*



4. Aktiver Parasitenbefall.
5. Aktive Malignomerkrankung.
6. Aktive Systemerkrankungen wie Tuberkulose, Kollagenosen, multiple Sklerose, AIDS-Erkrankung.
7. Schwere internistische Erkrankungen, z.B. schwere dekompensierte Organerkrankung des Herzens, der Leber, der Niere oder Diabetes Mellitus.
8. Zustand nach Organtransplantation.
9. Teilnahme an AMG Studien in den letzten 8 Wochen.
10. Schwangerschaft.

**Zusätzliches Ausschlusskriterium in unserer Studie:**

11. Aktuelles Rauchen.

**Einschlusskriterien „Kontrollproband“ aus der UBA-Studie:**

- a. Keine der im folgenden genannten Symptome der oberen Atemwege, die auf eine allergologische Erkrankung hindeuten: Niesen, Juckreiz, Naselaufen, Augenjucken, verstopfte Nase, retronasaler Schleimfluss, Husten, Asthmaanfälle, Infektneigung, saisonale Häufung der Beschwerden.
- b. Alter zwischen 20 und 65 Jahren.
- c. Die Patientin / der Patient muss seinen Hauptwohnsitz seit mindestens 20 Jahren in der jeweiligen Region (Nordrhein-Westfalen, bzw. Bayern) haben.
- d. Einverständnis gemäß Einverständniserklärung ( siehe Anlage).

**Ausschlusskriterien „Kontrollproband“ aus der UBA-Studie:**

1. Anamnestisch bekannte oder aktuelle psychische Erkrankung oder Störung, die die Fähigkeit der Patienten beeinträchtigen kann, die Anforderungen der Prüfung zu verstehen, an der Prüfung teilzunehmen oder die Einwilligung nach Aufklärung zu geben.
2. Anamnestisch bekannte(r) oder aktuelle(r) Abhängigkeit oder Mißbrauch von Alkohol oder Medikamenten.
3. Einnahme von langwirkenden Antihistaminika in den letzten 72 Stunden und/oder Einnahme von systemischen Glukokortikoiden in den letzten 7 Tagen und/oder Einnahme von Immunsuppressiva.
4. Aktiver Parasitenbefall.
5. Aktive Malignomerkrankung.

6. *Aktive Systemerkrankungen wie Tuberkulose, Kollagenosen, multiple Sklerose, AIDS-Erkrankung.*
7. *Schwere internistische Erkrankungen, z.B. schwere dekompensierte Organerkrankung des Herzens, der Leber, der Niere oder Diabetes Mellitus.*
8. *Zustand nach Organtransplantation.*
9. *Teilnahme an AMG Studien in den letzten 8 Wochen.*
10. *Schwangerschaft.*

**Zusätzliches Ausschlusskriterium in unserer Studie:**

11. *Aktuelles Rauchen.*

## 6.2 Ethikvotum



Technische Universität München



**Antrag an die Ethikkommission:**

### **Effekte von Lipidmediatoren bei allergischen Erkrankungen der oberen Atemwege**

#### Antragssteller

Verantwortlicher und Koordinator:  
Dr. med. Adam Chaker  
HNO-Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München  
Telefon: 089 4140-5996

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Carsten Schmidt-Weber  
Zentrum Allergie und Umwelt  
An der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein,  
Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München, Biedersteiner Straße  
29, 80802 München  
Telefon: 089 4140-3450

Prof. Dr. Hubert Hautmann  
Pneumologische Abteilung der 1. Medizinischen Klinik  
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München  
Telefon: 089 4140-2363

PD Dr. Murat Bas  
HNO-Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München  
Telefon: 089 4140-5380

Univ.-Prof. Dr. med. Henning Bier  
HNO-Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München  
Telefon: 089 4140-2370

Die Verantwortung für das Projekt obliegt den Antragstellern.

#### **Finanzierung und Dauer der Studie:**

Für dieses Projekt wurde ein Antrag auf Projektförderung bei der KKF der hohen medizinischen Fakultät der Technischen Universität München gestellt. Es ist geplant, auf Basis einer positiv beschiedenen Projektförderung einen Antrag auf Sachbeihilfe bei der deutschen Forschungsgemeinschaft zu stellen. Geplante Dauer des Gesamtprojektes: 3 Jahre

#### **Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik**

**Direktor der Klinik**  
Univ.-Prof. Dr. Henning Bier

**Sekretariat**  
Tel: (089) 4140-2370  
Fax: (089) 4140-4853  
Email: [hno@lrz.tu-muenchen.de](mailto:hno@lrz.tu-muenchen.de)

**Ambulanz für Allergologie und Angioödeme**  
PD Dr. M. Bas  
Email: [basmurat@web.de](mailto:basmurat@web.de)  
Mittwoch 9:00-12:00 Uhr  
15:00-17:00 Uhr

**Anmeldung:**  
Privatpatienten:  
Tel: 089 4140 2370  
Allgemein:  
Tel: 089 4140 -2390/ -2392

**Webseiten der Klinik**  
<http://www.med.tu-muenchen.de/>

**Koordination dieser Studie:**  
Dr. Adam Chaker  
Email: [a.chaker@lrz.tu-muenchen.de](mailto:a.chaker@lrz.tu-muenchen.de)

**Prüfzentren:**

HNO-Klinik  
Klinikum rechts der Isar  
Ismaninger Strasse 22  
81675 München

Pneumologische Abteilung der 1. Medizinischen Klinik  
Klinikum rechts der Isar  
Ismaninger Strasse 22  
81675 München

Zentrum für Allergie und Umwelt  
Helmholtz Zentrum und Technische Universität München  
Biedersteiner Str. 29  
80802 München

— **Kooperationspartner:**

Dr. Matthias Schiemann  
Technische Universität München  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
Trogerstr. 30  
81675 München

— Dr. Mohamed Shamji  
Allergy and Clinical Immunology  
National Heart and Lung Institute - SAF  
Imperial College  
Exhibition Road, London SW7 2AZ, Vereinigtes Königreich

**Prüfärzte:**

HNO-Klinik  
Herr Ulrich Strassen  
Frau Zuzana Hajdu  
PD Dr. med. Murat Bas, HNO-Klinikum Rechts der Isar  
Dr. med. Adam Chaker, HNO Klinikum Rechts der Isar

Pneumologische Abteilung der 1. Medizinischen Klinik  
Dr. Pelz  
Prof. Dr. H. Hautmann

## Synopse

Allergische Erkrankungen der oberen Atemwege nehmen kontinuierlich zu. Allergische Rhinitis ist die häufigste allergische Erkrankung mit einer Prävalenz von ca. 25 % in der entwickelten Welt – Tendenz weiterhin steigend. Die Sozioökonomische Bedeutung ist erheblich und basiert auf zwei Faktoren: Reduktion der Lebensqualität und Produktivität sowie Zunahme von Gesundheitsausgaben aufgrund medizinisch relevanter Komplikationen (z.B. Sinusitis, Asthma, Lebensmittelallergien). Der vorliegende Antrag untersucht die komplexe Interaktion zwischen adaptiver und innater Immunität der allergischen Rhinitis mit und ohne allergisches Asthma bronchiale anhand von humanen, translationalen Provokationsmodellen in vivo mit besonderem Schwerpunkt der Lipidmediatoren und Ihrer Interaktion in den Entzündungsnetzwerken. An insgesamt 3 Kollektiven sollen diese Effekte untersucht werden: 20 Probanden mit allergischer Rhinitis gegen Gräserpollen werden außerhalb der Allergiesaison nasale Allergenprovokationen erhalten und während 24 Stunden nasale Funktion, Symptome, Lipidmediatoren mit Ihrem Metabolom und Zytokine gemessen, Basophile und T-Zellen in der Nase im FACS charakterisiert. Innerhalb des Zeitraumes von einem Jahr sollen insgesamt 20 Patienten mit allergischem Asthma bronchiale induzierte Sputen generieren, die die gleichen Meßpanel durchlaufen. An Gewebe von 20 Patienten, die sich einer Operation der Nase oder Nasennebenhöhlen unterziehen, wird die Rezeptorexpression von Lipidmediatoren bei Basophilen, Mastzellen und T-Zellen in konfokalen Mikroskopien untersucht.

## **Angaben zum Forschungsvorhaben**

### **Hintergrund und wissenschaftliche Begründung des Projektes**

Die Inzidenz IgE-vermittelter, allergischer Erkrankungen der oberen Atemwege steigt kontinuierlich an. Derzeit liegt sie bei ca. 25 % in den Industrienationen [1]. Zugleich steigt hiermit die Prävalenz von Asthma bronchiale [2, 3]. Eine allergische Rhinitis geht (adjustiert auf IgE-Level, familiäres Asthmarisiko, Rauchgewohnheiten, Geschlecht und Alter) mit einem 3,53-fach (CI: 2,11-5,91) erhöhten Risiko einher, innerhalb von 8 Jahren an einem Asthma bronchiale zu erkranken [2].

Bei sensibilisierten Patienten führt Allergenexposition in den Atemwegen innerhalb weniger Minuten zu einer IgE- und mastzellvermittelten Frühphase, die in der Nase zu Juckreiz, nasaler Obstruktion, Rhinorrhoe sowie zu konjunktivalen Reaktionen führt. In der Lunge kommt es zu einer reversiblen Bronchokonstriktion und Hypersekretion. Wenige Stunden (ca. 4-7h) nach Exposition tritt eine T-Zellvermittelte Spätphasereaktion ein, bei der zusätzlich zu den in der Frühphase freigesetzten Mediatoren wie z.B. Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen eine Sekretion von Th2 Zytokinen wie z.B. IL-4 erfolgt [4].

Die Infiltration durch allergenspezifische T-Zellen bei allergischer Rhinitis und Asthma bronchiale führt bei chronisch-repetitiver Exposition zu einer allergischen Entzündungsreaktion mit Gewebeeosinophilie [5, 6] und resultiert in den unteren Atemwegen in einem Gewebeumbau, der als Remodeling bezeichnet wird [7]. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer allergischen Entzündung der oberen Atemwege zu einer Infiltration durch eosinophile Granulozyten in den unteren Atemwege führt und vice versa zu einer Basophilenakkumulation in der Nase, woraus das Konzept der „United Airways“ formuliert wurde [8-10].

Im Fokus der Pathogenese der chronischen Entzündung der Atemwege und der Haut stehen funktionell adaptierte T-Zellsubtypen (Th2, Th22, Th17) [11-13], im Fokus der Protektion und allergenspezifischen Immuntherapie regulatorische T<sub>reg</sub> Zellen [14]. Die Regulation früher und innater Entzündungsmechanismen im Rahmen der allergischen Entzündungsreaktion ist derzeit bis auf die Mastzellreaktion nicht bekannt. So spielen Lipidmediatoren, Leukotriene und Prostaglandine eine entscheidende Rolle.

Die Vernetzung der innaten Antwort über IL-4 und IL-3 sowie IL-33 sowie mögliche feed-back Mechanismen sind vor allem im Zielorgan nicht untersucht. Die Rolle von Lipidmetaboliten sowie ihren möglichen Regulatorischen Einfluss muss ebenfalls beleuchtet werden.

Potentiell inflammatorisch protektive Lipide wie Protektin wurden in kleinen Fallzahlen bei akuten Exazerbationen asthmatischer Erkrankungen untersucht, allerdings noch nicht in den oberen Atemwegen und nicht in systematischen großen Studien oder Kohorten. Ihre biologischen Zielstrukturen im Menschen und ihre Vernetzung in den Entzündungsnetzwerken sind in vivo nicht dargestellt.

### **Fragestellung:**

Welche Rolle nehmen Lipidmediatoren und Metaboliten in den verschiedenen Phasen der allergischen Entzündungsreaktion in der Nase und in den Bronchien ein? Wird die Entzündungsreaktion

durch Lipide oder Ihr Metabolom reguliert? Zu welchem Zeitpunkt spielt die Produktion von Entzündungsmediatoren durch Basophile und T-Zellen eine Rolle?

**Ziele:**

Das Forschungsprojekt soll zum einen die Rolle adaptiver und innater zellulärer Reaktionen in der Nasenschleimhaut beleuchten, in dem in Provokationsmodellen longitudinal und OP-Präparaten in einer Querschnittsuntersuchung die Kinetik der Zytokin- und Mediatorexpression von Basophile und T-Zellen untersucht wird. Zum anderen sollen mittels einer Metabolomplattform die Rolle von Lipid-metaboliten hypothesenfrei untersucht werden. Für möglicher Weise protektive Lipide, wie Maresine, Lipoxine und Protectine sollen im Rahmen der bei der KKF beantragten Projektförderung präliminäre Daten generiert werden, die eine Poweranalyse zur Fallzahlab-schätzung für einen folgenden DFG-Antrag ermöglicht.

**Studiendesign:**

Es handelt sich um eine translationale, experimentelle Provokationsstudie (Nicht-AMG). Insgesamt werden 3 Kollektive, hiervon zwei in longitudinalem Setting und eine im Querschnitt untersucht.

1. 20 Patienten mit allergischer Rhinitis gegen Gräserpollen werden außerhalb des Pollenfluges nasal mit Allergenen provoziert.
2. 20 Patienten mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma werden bei fehlender Allergenexposition (z.B. außerhalb der Pollensaison) einer Salzsoleninhalation zur Sputuminduktion unterzogen.
3. Bei 20 Patienten, die sich aufgrund einer chronischen Sinusitis oder einer Septumdeformität in der HNO-Klinik einer Nasen- oder Nasennebenhöhlenoperation unterziehen, werden Nasenschleimhautproben immunhistochemisch und konfokal-mikroskopisch untersucht.

**Nasale Allergenprovokationen**

Für diese Studie werden bis zu 20 Patienten mit gesicherter allergischer Rhinitis gegen Gräserpollen außerhalb der Allergiesaison als Probanden rekrutiert und nasal allergenprovoziert. Hierbei sind wiederholte Provokationen an bis zu drei aufeinander folgenden Tagen möglich, um eine persistierende Exposition unter natürlichen Bedingungen zu simulieren. Provokationen werden standardisiert mit 25.000 BU Gräserpollenmischung (Allergopharma) durchgeführt. Nach 5 Minuten, 15 Minuten und dann stündlich bis 7h, und 24h nach Exposition werden Nasensekrete, nasale Küretagen sowie Funktionsmessungen und Symptombestimmungen durchgeführt. Die Durchführung dieser Provokationsstudien, das Notfallmanagement für die Studienpatienten sowie die zeitkritische, standardisierte Weiterverarbeitung der Proben sind in der Gruppe hervorragend etabliert.

### **Gewinnung von Nasensekret, nasalen Küretagen, Blutzellen und Serum**

Nach der Provokation erfolgt die Messphase mit stündlich durchzuführender Rhinomanometrie und Sekretgewinnung. Das Nasensekret wird mittels der Disc-Methode gewonnen. Zeitpunkte zur Sekretgewinnung sind t=0 (vor Challenge), 5 min, 15 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h und 24h nach Exposition. Die Filterpapierstreifen („discs“), in denen das Sekret aufgefangen wird, werden vor dem Experiment gewogen, um den Leerwert zu bestimmen. Zum Auffangen des Sekrets werden sie auf der provozierten Seite auf das anteriore Nasenseptum aufgebracht und nach 45 Sekunden wieder entnommen. Es folgt eine erneute Wägung der Filterpapierstreifen; die Differenz (in mg) der beiden Wägungen entspricht der Sekretmenge (in µL). Zur Sekret-Extraktion werden die Streifen mit 500 µL inkubiert und bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Filterpapiers wird die Lösung á 2 x 250µL aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Die Kürettage zur nicht-invasiven Gewinnung von Nasenschleimhaut-Epithel erfolgt jeweils zum Zeitpunkt t=0, t=6h und am Ende des Experiments (t=24h). Unter Sicht wird eine RNase-freie Kürette auf der Provokationsseite in die untere Nasenmuschel eingeführt. Durch vorsichtiges Abstreichen der Kürette entlang der Wand der unteren Nasenmuschel werden Zellen der oberen Schleimhautschicht gewonnen. Der Inhalt der Kürette wird in 100µL Puffer, vorgelegt in einem sterilen 1,5 mL Eppendorf-Cup, aufgenommen und durchflußzytometrisch untersucht.

PBMC werden mit CPT-Tubes aus Vollblut in einem Schritt isoliert, zudem werden 10 ml Serum im gleichen Schritt zu den Zeitpunkten t=0, t=1h und t=7 h entnommen.

### **Induziertes Sputum**

Das Induzierte Sputum gibt uns einen Einblick in den pro-inflammatorischen Status der Bronchien. Die Generierung dieses Sputums mittels hyperosmolarer Inhalation von NaCl erfolgt über einen Zeitraum von 3\* 7 Minuten mit ansteigenden Konzentrationen NaCl 3 %- 5% Sole in Kooperation mit der Abteilung für Pneumologie.

Zunächst wird die FEV1 (Bester von 3 Versuchen) bestimmt, hiernach erfolgt die Inhalation von 400 µg Salbutamol und die post-beta2 FEV1 nach 10 Minuten. Hiernach werden über einen Vernebler über 7 Minuten zunächst 3 %ige NaCl Sole inhaliert. Im Anschluss erfolgt eine erneute FEV1 Messung sowie Abhusten und Auffangen des Sputums. Bei starken Symptomen und/oder Abfall um ≥ 20 % von der post-beta2 FEV1 wird Salbutamol inhaliert und die Sputuminduktion gestoppt. Bei Abfall der post-beta2 FEV1 um bis zu 10 % wird die Sputuminduktion mit 4 %iger und im nächsten Schritt mit 5 %iger NaCl Sole fortgesetzt. Das Notfallmanagement für die Studienpatienten ist durch die klinisch hervorragend etablierte Maximalversorgung etabliert.



### **Zielparameter:**

- a.) Nasale Provokation:
  - a. Primärer Zielparameter: Nasaler Flow und Sekretgewicht über Zeit
  - b. Sekundäre Zielparameter:
    - i. Frequenz T-Zellen und Basophile über Zeit im Nasensekret und Blut
    - ii. Konzentration PGD<sub>2</sub>, IL-4, IL-13 im Nasensekret über Zeit
    - iii. Kinetik des Lipidoms im Nasensekret und Serum über Zeit: hypothesenfreie Charakterisierung beteiligter Lipide und ihrer Abbauprodukte
    - iv. Symptome (TNSS über Zeit)
- b.) Induziertes Sputum
  - a. Primärer Zielparameter: FEV1 in ml über Zeit
  - b. Sekundäre Zielparameter:
    - i. Konzentration PGD<sub>2</sub>, IL-4, IL-13 im Sputum
    - ii. Charakterisierung des Lipidoms im Sputum und Serum
- c.) Biopsate der Nasenschleimhaut
  - a. Primärer Zielparameter: Immunhistochemische Analyse von T-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen
  - b. Sekundäre Zielparameter:
    - i. Untersuchung der Rezeptorexpression für Lipide
    - ii. PCR Untersuchung der Rezeptorexpression für Lipide

### **Nutzen und Risiko des Forschungsprojektes**

Es handelt sich um eine experimentelle Nicht-AMG Studie. Alle in dieser Studie verwendeten Tests sind bereits entweder in der klinischen Routine und Patientenversorgung eingesetzt oder sind als experimentelle Methoden allgemein anerkannt und verfügen über ein sehr gutes Sicherheitsprofil.

Für den Haut-Prick Test werden Allergenlösungen auf die Haut aufgetragen und mit einer feinen Nadel in die Haut eingebracht (allergologische Standarddiagnostik). Dieser Test ist nicht schmerzhaft und wird auch durch Kinder gut akzeptiert. Bei entsprechender Sensibilisierung auf die getesteten Allergene im Hauttest kommt es zu einer Hautrötung, Quaddelbildung und Juckreiz. Nach ca. 15-20 Minuten lässt diese Reaktion nach. Eine systemische allergische Reaktion durch den Test ist sehr unwahrscheinlich. In sehr seltenen Fällen kann es zu systemischen Reaktionen mit Luftnot, Asthma, anaphylaktischen Schock kommen. Solche sehr seltenen, schwerwiegenden Nebenwirkungen bedürfen gegebenenfalls einer intensivmedizinischen Behandlung. Die Studienärzte sind mit den Methoden der Allergologie vertraut und erfahren und können diese Notfälle adäquat behandeln.

Die bei der Untersuchung durchzuführende Blutabnahme kann schmerzhaft sein und zu einem blauen Fleck an der Entnahmestelle führen. Sehr selten können Nervenverletzungen oder Infektionen auftreten.

Die Einlage von Filterpapierstreifen in die Nase zum Sammeln von Nasensekret nach nasaler Allergenprovokation kann Niesreiz hervorrufen.

Die Nasenabstriche mit Küretten erlauben eine oberflächliche Entnahme von Zellen aus dem Gebiet der unteren Muschel in der Nase mittels eines Abstrichinstrumentes (Kürette) vorzunehmen, ohne dass diese hierbei „verletzt“ wird. In sehr seltenen Fällen kann es dabei zu vorübergehender Reizung der Schleimhaut, Niesreiz, Augentränen oder Blutungen kommen.

Die nasale Allergenprovokation außerhalb der Pollensaison ist das Goldstandardverfahren zur Überprüfung der funktionellen Relevanz von Allergenen und eine sichere, auch in unserer Routinediagnostik der Allergiesprechstunde etablierte Methode. Nach ca. 15 Minuten ist die akute Phase beendet. Ca. 6 Stunden nach nasaler Allergenprovokation kann allerdings wieder eine Nasenatmungsbehinderung, Niesen, Juckreiz oder auch eine systemische Reaktion stattfinden. In sehr seltenen Fällen kann es zu systemischen Reaktionen mit Luftnot, Asthma und bis zum allergischen Schock kommen. Dieses ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Die Studienärzte sind mit der Behandlung dieser Notfälle vertraut, die notwendige Ausrüstung ist einsatzbereit.

Bronchiale Inhalationen mit einer konzentrierten Salzsole führen zu Husten und zu gesteigerter bronchialer Sekretion von Schleim. Gelegentlich treten asthmatische Reaktionen, schwere Hustenattacken und in seltenen Fällen Luftnot auf. Die Gabe von Beta2-Mimetika, wie z.B. Salbutamol kann gelegentlich zu einem trockenen Mund, Nervosität, Herzklopfen und zu leichtem Zittern führen. Alle genannten möglichen Nebenwirkungen sind in der Regel innerhalb kurzer Zeit wieder rückläufig.

#### **Auswahl und Anzahl der Patienten**

Die Patienten für diese Studie werden aus der laufenden Allergiesprechstunde der HNO-Klinik rekrutiert. Insgesamt ist es geplant bis zu 60 Patienten in diese Studie einzuschliessen.

#### **Einschlusskriterien**

Patienten, die an dieser Studie teilnehmen möchten, müssen im Alter zwischen 18-70 Jahre sein und ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme gegeben haben.

Entsprechend der drei Substudienkollektive finden folgende Kriterien Anwendung:

- a.) Patienten mit einer gesicherten allergischen Rhinitis gegen Gräserpollen
  - a. Positive Quaddel für Gräserpollen > 3mm im Vergleich zur Positiv und Negativkontrolle im Haut-Prick Test
  - b. Anamnese einer saisonalen allergischen Rhinitis seit mehr als 2 Jahren
  - c. Nachweis von spezifischem IgE gegen Gräserpollen mindestens RAST Klasse 2
- b.) Patienten mit allergischer Rhinitis und begleitendem allergischen Asthma

Protokoll Lipidmediatoren Allergie v1.0

- a. Nachweis einer relevanten allergischen Sensibilisierung gegen saisonale Allergene im Haut-Prick Test als positive Quaddel für Gräser- und/oder Kräuter/Frühblüher Pollen > 3mm im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.
- b. Anamnese einer saisonalen allergischen Rhinitis mit begleitenden saisonalen asthmatischen Beschwerden mindestens in einer Allergiesaison der letzten 3 Jahre
- c.) Patienten mit chronischer Sinusitis oder Rhinitis, die sich einer Operation der Nase- und oder Nasennebenhöhlen unterziehen

#### **Ausschlusskriterien**

Patienten mit schwerem Asthma bronchiale und einer FEV1 unter Therapie von unter 80 % des Sollwertes werden nicht in der Nase allergenproviziert und auch nicht einer bronchialen Sputuminduktion unterzogen. Patienten in der Schwangerschaft, Stillzeit, Minderjährige (Alter <18 Jahre), Medikation mit systemischen Steroiden, ACE-Hemmern, Betablockern oder immunsuppressiv wirkenden Substanzen (1 Monat) sowie Patienten mit schweren systemischen Erkrankungen, insbesondere Herz-Kreislaufkrankungen oder Malignomen, werden von den Untersuchungen ausgeschlossen. Vor Provokationstestungen müssen folgende Karenzfristen berücksichtigt werden: 3 Tage für DNCG, Nedocromil, 1 Woche für nasale und orale Antihistaminika, 1 Monat für systemische Steroide, 14 Tage für nasale Steroide.

#### **Biometrie**

Es handelt sich um eine präliminäre Studie, mit welcher wir die Grundlage für eine adäquat dimensionierte experimentelle confirmatorische Studie generieren möchten. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgt mit Graph Pad Prism unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als Repeated-Measurement ANOVA für die Zytokin- und Mediatorkonzentrationen nach nasaler Allergenprovokation, sowie als paarige student's T-Test Messungen für Sputumanalysen.

#### **Grundsätze**

Es handelt sich um eine wissenschaftlich-experimentelle Studie im Sinne einer Nicht-AMG Studie. Eine Durchführung der Studie ist an die zustimmende Stellungnahme der Ethikkommission gebunden. Die Grundsätze für eine ordnungsgemäße Durchführung im Sinne der Deklaration von Helsinki und der „Note for Guidance on Good Clinical Practice“ (GCP) der ICH werden gewahrt.

#### **Datenmanagement**

Sämtliche Originaldaten werden in Papierformat erhoben und verbleiben entsprechend der DFG-Empfehlungen zur guten wissenschaftlichen Praxis für mindestens 10 Jahre in dem jeweiligen Untersuchungszentrum.

## **Unterschriften**

München, 29.07.2011

---

(Dr. med. Adam Chaker)

---

(Univ.-Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber )

---

(Prof. Dr. Hubert Hautmann)

---

(PD Dr. Murat Bas)

---

(Univ.-Prof. Dr. Henning Bier)

Anlagen:

Literaturverzeichnis, CV (Hauptprüfer)

Probandeninformation und Einverständniserklärung

Formblatt Interessenskonflikte

Formblatt Stellungnahme des Klinikdirektors

Protokoll Lipidmediatoren Allergie v1.0

## 6.3 Probandeninformation

Eine gemeinsame Studie der Hals-Nasen-Ohrenklinik und  
der Pneumologischen Abteilung der 1. Medizinischen Klinik  
des Klinikums rechts der Isar



Technische Universität München



### Probandeninformation

#### **Effekte von Lipidmediatoren und anderen Entzündungsfaktoren bei allergischen Erkrankungen der oberen Atemwege**

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

Sie werden gebeten an einer Studie teilzunehmen, mit der wir Mechanismen der Entstehung von Allergien und Asthma in Ihrer Nasenschleimhaut und den Bronchien untersuchen möchten.

Ehe Sie Ihr Einverständnis geben, lesen Sie bitte dieses Schreiben durch und lassen sich von Ihren betreuenden Ärzten eingehend aufklären, falls Sie etwas nicht verstehen.

Allergische Rhinitis (vielen als „Heuschnupfen“ bekannt) ist eine Erkrankung, deren Häufigkeit in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat. Sie wird bei Menschen mit einer Sensibilisierung durch an sich eigentlich nicht krankmachende Allergene ausgelöst und führt zu den typischen Symptomen wie Augen- und Nasenjucken, Niesen und übermäßiger Sekretproduktion. Desweiteren führt eine allergische Rhinitis häufig zu einem sogenannten Etagenwechsel in den Atemwegen, es kann ein Asthma entstehen. Die Wahrscheinlichkeit, weitere Allergien zu entwickeln, wenn man bereits gegen ein Allergen sensibilisiert ist, ist deutlich erhöht, auch können Kreuzallergien und Nahrungsmittelallergien auftreten.

#### **Ziel der Studie:**

Mit dieser Studie helfen Sie uns zu verstehen, welche Botenstoffe zu den verschiedenen Zeitpunkten einer allergischen Reaktion der Nase oder der Bronchien beteiligt sind. Die genaue Kenntnis dieser Botenstoffe, ihrer Herstellung durch Abwehrzellen sowie ihrer Rolle im Entzündungsnetzwerk können helfen, zukünftig die Therapiemöglichkeiten der allergischen Rhinitis und von allergischem Asthma verbessern.

#### **Vorgehensweise:**

Die Studie wird durchgeführt gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI). Da es nicht um eine Therapiestudie, sondern um eine diagnostisch-wissenschaftliche Studie handelt, erhalten Sie kein Studienmedikament. Bei manchen Probanden werden wir nur Blut abnehmen, bei einigen eine bronchiale Provokation mit konzentrierter Soleinhalation im und außerhalb des Pollenfluges durchführen und bei einem Teil der Probanden außerhalb des

Anmeldung HNO-Klinik  
Tel: 089 4140 -2390/ -2392

Webseiten der Klinik  
<http://www.med.tu-muenchen.de/>

Koordination dieser Studie:  
Dr. Adam Chaker

Pollenfluges eine nasale Allergenprovokation durchführen. Es handelt sich um ein Grundlagenforschungsprojekt, bei welchem wir die gewonnenen Proben im Labor auf für die Vermittlung von Allergien wichtigen Botenstoffe untersuchen werden. Ihre Teilnahme an jeder dieser Untersuchungen ist freiwillig.

#### **Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien und allgemeine körperliche und HNO-ärztliche Untersuchung (Screening-Visit):**

Vor Aufnahme in die Studie erhalten Sie diese Patienteninformation und werden genau über den Ablauf der Studie, die Art der Allergenprovokation, die Probengewinnung und über mögliche Risiken informiert. Nachdem Sie schriftlich Ihr Einverständnis für die Teilnahme an dieser Studie erklärt haben, werden Sie untersucht. Hierbei werden ein HNO-Status, eine Lungenfunktionsprüfung sowie ein Allergiehauttest durchgeführt. Ferner entnehmen wir Ihnen ca. 5ml Blut, um in Ihrem Blut allergenspezifische Antikörper (IgE) zu bestimmen.

Bei allen weiblichen Studienteilnehmerinnen vor der Menopause (d.h. der letzten Regel) ist ein Schwangerschaftstest im Urin erforderlich. Als Schwangere oder Stillende dürfen Sie an dieser Studie nicht teilnehmen.

#### **Nasale Allergenprovokation, nasale Küretagen und Blutabnahmen**

Um eine allergische Reaktion auszulösen, sprühen wir eine definierte Menge Gräserpollenlösung einseitig in Ihre Nase. Dieses führt innerhalb kurzer Zeit zu Juckreiz, Niesreiz und Naselaufen. Wir sammeln das Nasensekret mit Filterpapierstreifen in Ihrer Nase vor, 15 Minuten und später stündlich nach der Provokation für insgesamt sieben Stunden sowie ca. 24 Stunden nach der Allergenprovokation. Vor, 6 Stunden und 24 Stunden nach Provokation entnehmen wir eine nicht traumatische Küretage – ähnlich einem Abstrich – aus der Nase zur Gewinnung von Nasenschleimhaut. Vor und 6 Stunden nach Provokation nehmen wir Ihnen insgesamt ca. 50 ml Blut ab.

In der Allergiesaison (d.h. im Pollenflug) führen wir keine Allergenprovokation durch. Bei Visiten in dieser Zeit nehmen wir Ihnen ca. 50ml Blut und entnehmen eine Küretage aus der Nase.

#### **Bronchiale Provokation mit konzentrierter Salzsoleninhalation**

Um Sputum (bronchiales Hustensekret) zu gewinnen, lassen wir Sie mit verschiedenen Konzentrationen (3-5 % Kochsalzgehalt) einer Salzsole über insgesamt 3 mal 7 Minuten inhalieren. Vorher und zwischen den Inhalationen bestimmen wir Ihre Lungenfunktion und Sie erhalten ein bronchierweiterndes Asthmaspray (Salbutamol), um besser abhusten zu können.

#### **Provokationsvisiten:**

Die nasalen Provokationen können an 3 aufeinander folgenden Tagen wiederholt werden, um eine Allergiesaison mit erhöhter Pollenexposition zu simulieren. Die bronchialen Provokationen finden einzeln an Tagen ohne Allergieprovokation statt.

#### **Messung von Allergiesymptomen und subjektivem Stress**

Allergien führen zu Beeinträchtigungen abseits von Niesen, Naselaufen, Juckreiz oder Husten. So konnte gezeigt werden, dass Allergien die Schlafqualität verschlechtern oder Reizbar machen. Dieses möchten wir mit standardisierten Fragebögen messen und in Bezug zu den Entzündungsmediatoren pseudonymisiert auswerten.

### **Mögliche Risiken und Unannehmlichkeiten:**

Die durchzuführenden **Blutabnahmen** können geringfügig schmerzhaft sein und zu einem blauen Fleck an der Entnahmestelle führen. Sehr selten können Nervenverletzungen oder Infektionen auftreten.

Die **nasale Allergenprovokation** ist der **Goldstandard** zur Diagnostik einer allergischen Rhinitis. Durch Verabreichung eines Allergensaerosols in die Nase wird künstlich eine Reaktion mit Niesen, Tränen, Juckreiz und Sekretfluss ausgelöst. Nach ca. 15 Minuten ist die akute Phase beendet. Ca. 6 Stunden nach nasaler Allergenprovokation kann allerdings wieder eine Nasenatmungsbehinderung, Niesen, Juckreiz oder auch eine systemische Reaktion stattfinden. In sehr seltenen Fällen kann es aber auch zu systemischen Reaktionen mit Luftnot, Asthma und sogar bis zum **allergischen Schock** kommen. Dieses ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Solche sehr seltenen, schwerwiegenden Nebenwirkungen bedürfen gegebenenfalls einer intensivmedizinischen Behandlung. Ihr Studienarzt ist mit der Methode der nasalen Allergenprovokation vertraut und erfahren und kann diese Notfälle adäquat behandeln. Die nasale Allergenprovokation wird in der HNO-Klinik des Klinikums rechts der Isar in der Patientenversorgung eingesetzt.

Die Einlage von **Filterpapierstreifen** in die Nase zum Sammeln von Nasensekret nach nasaler Allergenprovokation kann Niesreiz hervorrufen.

**Nasale Küretagen** erlauben eine oberflächliche Entnahme von Zellen aus dem Gebiet der unteren Muschel in der Nase mittels eines Abstrichinstrumentes (Kürette) vorzunehmen, ohne dass Sie hierbei „verletzt“ werden. In sehr seltenen Fällen kann es zu vorübergehender Reizung der Schleimhaut, Niesreiz und Augentränen kommen, Blutungen sind sehr selten.

**Bronchiale Inhalationen** mit einer konzentrierten Salzsole führen zu Husten und zu gesteigerter bronchialer Sekretion von Schleim. Sie können gelegentlich zu asthmatischen Reaktionen, schweren Hustenattacken und in seltenen Fällen zu Luftnot führen. Die Gabe von Asthmaspray kann gelegentlich zu einem trockenen Mund, Nervosität, Herzklopfen und zu leichtem Zittern führen. Alle genannten möglichen Nebenwirkungen sind in der Regel innerhalb kurzer Zeit wieder rückläufig.

Während der Dauer der klinischen Prüfung sollte eine andere medizinische Behandlung mit Ausnahme von Notfallsituationen nur im Einvernehmen mit dem Prüfarzt erfolgen. **Der klinische Prüfer ist von einer Notfallbehandlung unverzüglich zu unterrichten.** Bei Verdacht auf einen studienbedingten Gesundheitsschaden sind Sie verpflichtet, dies dem klinischen Prüfer unverzüglich anzuzeigen.

Sollten Sie Fragen zu dieser Studie haben fragen Sie Ihren betreuenden Prüfarzt. Er beantwortet Ihre Fragen gern.

### **Aufwandsentschädigung für Ihre Teilnahme:**

Die Teilnahme an der Allergenprovokation und Untersuchungen sind kostenfrei. Sie erhalten eine Aufwandsentschädigung für die Teilnahme an dieser Studie. Für die Teilnahme an einer nasalen Provokationsprüfung mit jeweils Blutentnahmen und Küretagen erhalten Sie insgesamt 80 € als Aufwandsentschädigung. Für die Teilnahme an einer bronchialen Provokationsprüfung erhalten Sie 30 € Aufwandsentschädigung. Wenn wir Ihnen Blut abnehmen, erhalten Sie hierfür 10 Euro, bei nasalen Küretagen sowie für das Ausfüllen der Fragebögen 10 Euro Aufwandsentschädigung.

**Die Teilnahme ist freiwillig/ alternative Behandlungsmethoden:**

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München hat der Durchführung dieser Studie in vorliegender Form zugestimmt. Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig und so können Sie die Teilnahme auch ablehnen. Sie können auch jederzeit Ihre Teilnahme beenden – ohne Nachteile für Ihre weitere Behandlung. Außerdem ist die Pflicht jedes Studienarztes die Studienbehandlung abubrechen, falls Risiken für Ihre Gesundheit bestehen.

Sollten Sie Fragen hinsichtlich dieser Studie haben, beobachten Sie Nebenwirkungen oder benötigen Sie medizinische Behandlung, dann wenden Sie sich bitte ohne zu zögern an Ihren Studienarzt unter der Telefonnummer 089- 4140 – 2390/2392.

**Datenschutz**

Die bei Ihnen erhobenen Messwerte werden auf einem Erfassungsbogen festgehalten, der anschließend in eine pseudonymisierte Computerdatei aufgenommen wird. Außer den zur Verschwiegenheit verpflichteten Prüfarzten und Versuchsleitern wird niemand Ihre Personalien erfahren. Die Belange des Datenschutzes sind gewährleistet.



## 6.4 Publikationen und Kongressbeiträge

Autoren	Titel	Journal
Zissler, U. M., Ulrich, M., Jakwerth, C. A., Rothkirch, S., Guerth, F., Weckmann M., Schiemann, M., Haller, B., Schmidt-Weber, C. B., Chaker, A. M.	Biomatrix for upper and lower airway biomarker in allergic asthma.	J Allergy Clin. Immunol. 2018; in press
Zissler, U. M., Chaker, A. M., Effner, R., Ulrich, M., Guerth, F., Piontek, G., Dietz, K., Regn, M., Knapp, B., Theis F. J., Heine, H., Suttner, K., Schmidt-Weber, C. B.	Interleukin-4 and interferon-gamma orchestrate an epithelial polarization in the airways.	Mucosal Immunology 2016; 9(4):917-26
Autoren	Titel	Kongress
Zissler UM, Jakwerth CA, Ulrich M, Bahmer T, Weckmann M, Chaker AM, Schmidt-Weber CB	Comparison of Upper and Lower Airway Biomarkers Diagnosing Allergic Asthma	DZL Annual Meeting 2018
Zissler UM, Jakwerth CA, Ulrich M, Bahmer T, Weckmann M, Chaker AM, Schmidt-Weber CB	Upper Airway Biomarkers Reflect Asthmatic Lung Inflammation	WIRM 2018
Zissler UM, Jakwerth CA, Ulrich M, Bahmer T, Weckmann M, Chaker AM, Schmidt-Weber CB	Diagnosing Allergic Asthma by Comparison of Upper and Lower Airway Biomarkers	MLC 2018
Zissler UM, Jakwerth CA, Ulrich M, Bahmer T, Weckmann M, Schmidt-Weber CB, Chaker AM	Potential of Upper Airway Mediators as Biomarkers for Asthmatic Lung	EAACI 2018

**Volltext (S.115-124):** Zissler, U. M., Ulrich, M., Jakwerth, C. A., Rothkirch, S., Guerth, F., Weckmann M., Schiemann, M., Haller, B., Schmidt-Weber, C. B., Chaker, A. M. (2016). Interleukin-4 and interferon-gamma orchestrate an epithelial polarization in the airways. *Mucosal Immunology*, 9(4), 917-926. doi:10.1038/mi.2015.110

# Interleukin-4 and interferon- $\gamma$ orchestrate an epithelial polarization in the airways

UM Zissler<sup>1</sup>, AM Chaker<sup>1,2</sup>, R Effner<sup>1</sup>, M Ulrich<sup>1,2</sup>, F Guerth<sup>1</sup>, G Piontek<sup>2</sup>, K Dietz<sup>1</sup>, M Regn<sup>3</sup>, B Knapp<sup>4</sup>, FJ Theis<sup>4,5</sup>, H Heine<sup>6</sup>, K Suttner<sup>1</sup> and CB Schmidt-Weber<sup>1</sup>

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-4 (IL-4) are key effector cytokines for the differentiation of T helper type 1 and 2 (Th1 and Th2) cells. Both cytokines induce fate-decisive transcription factors such as GATA3 and TBX21 that antagonize the polarized development of opposite phenotypes by direct regulation of each other's expression along with many other target genes. Although it is well established that mesenchymal cells directly respond to Th1 and Th2 cytokines, the nature of antagonistic differentiation programs in airway epithelial cells is only partially understood. In this study, primary normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) were exposed to IL-4, IFN- $\gamma$ , or both and genome-wide transcriptome analysis was performed. The study uncovers an antagonistic regulation pattern of IL-4 and IFN- $\gamma$  in NHBEs, translating the Th1/Th2 antagonism directly in epithelial gene regulation. IL-4- and IFN- $\gamma$ -induced transcription factor hubs form clusters, present in antagonistically and polarized gene regulation networks. Furthermore, the IL-4-dependent induction of IL-24 observed in rhinitis patients was downregulated by IFN- $\gamma$ , and therefore IL-24 represents a potential biomarker of allergic inflammation and a Th2 polarized condition of the epithelium.

## INTRODUCTION

The airway epithelium plays an important role as physical barrier to the environment, counteracts invasive microbes, and deals with harmless components such as pollen or other particles. Defense mechanisms range from apoptosis to limit intracellular infections down to passive protective reactions such as membrane reinforcement or mucus production.<sup>1</sup> By physical interaction of T cells with the epithelium, not only defense mechanisms but also regeneration or even immunosuppressive mechanisms are induced.<sup>2</sup> These T cells originate from a common antigen-naïve precursor cell that differentiates either into T helper type 1 or 2 (Th1 or Th2) cells or other T-cell subtypes in a process of antagonistic regulation that allows the phenotypic polarization. Specifically Th1-derived interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) inhibits Th2 cell differentiation, whereas Th2-derived interleukin-4 (IL-4) inhibits the fate in favor of Th1 differentiation. These key cytokines are also recognized by airway epithelial cells, but whether airway epithelial cells

respond to IL-4 and IFN- $\gamma$  by antagonistic gene regulation is only partially understood. The resulting polarization in transcriptional regulation of epithelial cells has been described for fate decision in pancreas cell development.<sup>3</sup> It is known that Th2-exposed epithelial cells can contribute to asthma by enhanced mucus production,<sup>4</sup> epithelial hyperplasia,<sup>5</sup> and enhanced matrix production.<sup>6</sup> Other well-known pro-allergic type 2 epithelial cytokines, such as IL-33, IL-18BP, or IL-1RL1, act on innate cells and can enhance IL-4 production.<sup>7-9</sup>

Th1 cells were previously described to play a role in multiple inflammatory airway disease such as cystic fibrosis,<sup>10</sup> sarcoidosis,<sup>11</sup> pulmonary tuberculosis,<sup>12</sup> bronchiolitis obliterans,<sup>13</sup> and hypersensitivity pneumonitis.<sup>14</sup> We and others have previously demonstrated that IFN- $\gamma$  has substantial effect on airway epithelial cells such as the induction of *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *MCP1*, *STAT1*, *ICAM*, *IL8*, *MHCI*, and *MHCII*.<sup>2,15</sup> Because of the chemokine induction and expression of lymphocyte relevant genes such as *ICAM* and *MHC*, it is

<sup>1</sup>Center of Allergy & Environment (ZAUM), Technical University of Munich and Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, Germany, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Munich, Germany. <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Medical School, Technical University of Munich, Munich, Germany. <sup>3</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical School, Technical University of Munich, Munich, Germany. <sup>4</sup>Institute of Computational Biology, Technical University of Munich and Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, Munich, Germany. <sup>5</sup>Department of Mathematics, Technical University of Munich, Garching, Germany and <sup>6</sup>Division of Innate Immunity, Research Center Borstel, Airway Research Center North (ARCN), Member of the German Center for Lung Research (DZL), Borstel, Germany. Correspondence: CB Schmidt-Weber (csweber@tum.de)

Received 2 July 2015; accepted 18 September 2015; doi:10.1038/imi.2015.110

hypothesized that Th1-primed epithelium can trigger inflammation by recruitment and support antigen-specific defense mechanisms at the epithelial surface. However, it is not clear whether Th1/Th2 programs exist in airway epithelial cells, and hence the relevance of changed ratios of lung-infiltrating Th1 and Th2 cells is not known.<sup>2</sup> In fact, it could be speculated that the infiltration of Th1 cells in an otherwise Th2-affected epithelium is beneficial. In addition, epithelial Th2 responses could be easily diagnostically assessed in disease conditions with unclear case history such as wheezing in newborns. This unmet clinical need can be noninvasively addressed by nasal lining fluids that contain abundant amount of epithelial cytokines with biomarker potential for diagnosis of allergic inflammation such as allergic rhinitis and allergic asthma.

We previously showed that explants from allergic inflammation (skin, upper and lower airways) contain “plastic” T-cell phenotypes secreting multiple cytokines in parallel, including IL-4 and IFN- $\gamma$ ,<sup>2</sup> raising the question of the functional consequence on the side of airway epithelial inflammation.

Essential for the IL-4-mediated polarization is an intact IL-4 receptor (IL-4R) downstream signaling. Airway epithelial cells do not only recognize IL-4, but also express the receptor for its structural homolog *IL13*. Both cytokines share the IL-4R $\alpha$  and the common  $\gamma$  chain ( $\gamma$ c) or the IL-13R $\alpha$  chain that activates the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathways. As a consequence, IL-4 is able to bind to two receptor (type I and type II) heterodimers consisting of either  $\gamma$ c/IL-13R $\alpha$  (type I) or IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$  (type II), whereas binding of IL-13 is restricted to type II.<sup>16</sup> The receptor complex that mediates IFN- $\gamma$  signaling consists of two species-matched chains: IFN- $\gamma$ R1 and IFN- $\gamma$ R2. IFN- $\gamma$ R1 is the major binding subunit for IFN- $\gamma$ , whereas IFN- $\gamma$ R2 increases the affinity of IFN- $\gamma$ R1 and is obligatory for transducing the IFN- $\gamma$  signal.<sup>17</sup> Like the IL-4R complex, the IFN- $\gamma$  receptors are expressed by airway epithelial cells and induce proinflammatory chemokines<sup>18</sup> and *MHCII* expression.<sup>2</sup>

The key hypothesis of this study was that IL-4 antagonizes IFN- $\gamma$ -mediated gene regulation in airway epithelial cells. Therefore, we studied whether antagonistic gene regulation prevails over synergistic gene induction along with its associated transcriptional network.

This study shows for the first time that airway epithelial cells are subjected to a transcriptional program similar to the Th1/Th2 antagonism known in lymphocytes. Notably, airway epithelial cells express several IL-4- or IFN- $\gamma$ -induced genes that are antagonized by IFN- $\gamma$  and IL-4 respectively.

## RESULTS

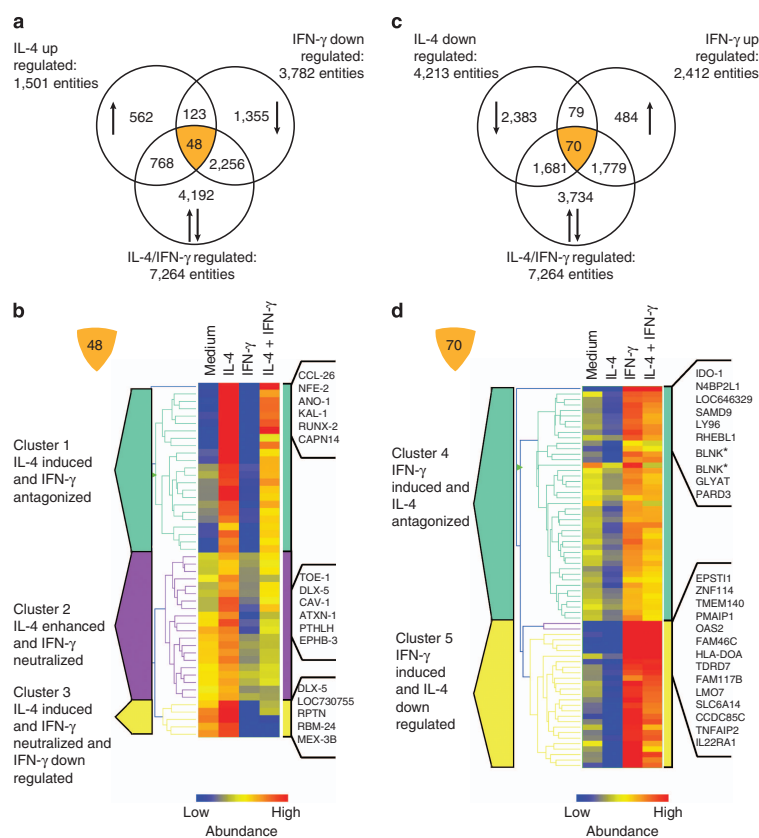
To understand the pathological consequences of T-cell plasticity on the human airway tissue, we coexposed normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) with IL-4 and IFN- $\gamma$  at the same time and discovered that IL-4 and IFN- $\gamma$  antagonize airway epithelial gene regulation.

### IL-4 and IFN- $\gamma$ antagonistic and synergistic gene regulation

Airway epithelial cells were exposed to the cytokines alone or in combination for visualization of IL-4- and IFN- $\gamma$ -induced antagonism. Although the response to IFN- $\gamma$  is well established in epithelial cells, the response to IL-4 is more complex and was monitored before the whole genome transcriptome assessment. Immunocytofluorescence stainings were used as quality control to demonstrate the homogenous distribution of the IL-4R $\alpha$  expression on the cell surface and cytoplasm of the majority of the cells (Supplementary Figure S1 online). In order to extract Th1/Th2-driven antagonistic gene regulation, NHBE cultures were exposed to IL-4 or IFN- $\gamma$  and coexposure was additionally analyzed. The cytokine-induced signaling resulted in 1,501 entities induced by IL-4 and 2,412 entities by IFN- $\gamma$  (Supplementary Figure S2, gene list in Supplementary Table S1). The Venn diagram analysis revealed the genes that are induced by IL-4 and downregulated by IFN- $\gamma$  and that still show changes in the presence of both cytokines (Figure 1a, center cut set). We found that the majority of genes were downregulated following cytokine treatments (Figure 1a,c). A cut set of 48 transcripts was regulated in the presence of both IL-4 and IFN- $\gamma$  (Figure 1b; gene list in Supplementary Table S2). These genes were hierarchically grouped into three clusters (clusters 1–3; Figure 1b) of which cluster 1 represents the strongest upregulated genes by IL-4 (Figure 1b). The genes highlighted in Figure 1b are the result of a hypothesis-free ranking of literature citation numbers for each gene. Thus, the most cited genes (PubMed) are ranking highest, whereas less cited are ranking lower and noncited the lowest. Consequently, less studied genes show lower ranking. Using this visualization, it is possible to get an unbiased view of the nature of the cluster on the current state of knowledge. For cluster 1, these included *CCL26*, *ANO1* and *RUNX2* as most literature-cited genes. The cluster 2 contained particularly IL-4-enhanced and IFN- $\gamma$ -neutralized genes and included the transcription factor *DLX5* (splice variant 1). Cluster 3 included IL-4-induced, IFN- $\gamma$ -neutralized, or IFN- $\gamma$ -antagonized genes containing *DLX5* (splice variant 2) and *MEX3B*.

The cut set of 70 genes is covering the genes (Figure 1d; gene list in Supplementary Table S3) that were IL-4 downregulated and IFN- $\gamma$  upregulated as well as regulated in the presence of IL-4 and IFN- $\gamma$  at the same time. Again, these genes were hierarchically grouped into two clusters (Figure 1d, clusters 4 and 5). For cluster 4, this included *IDO1* and *LY96*. The cluster 5 carried IFN- $\gamma$ -induced and IL-4 downregulated gene expression and covered *TNFAIP2* and *IL22RA1*.

In addition to antagonistic gene regulation, the synergistic induction of genes was investigated as well. For this purpose the cut set of genes was analyzed that are only induced in the presence of IL-4 and IFN- $\gamma$  at the same time but not in the presence of only one of them. The cut set comprised 530 genes (Supplementary Figure 3a) in the case of IL-4- and IFN- $\gamma$ -induced genes and 1,378 genes in the case of IL-4

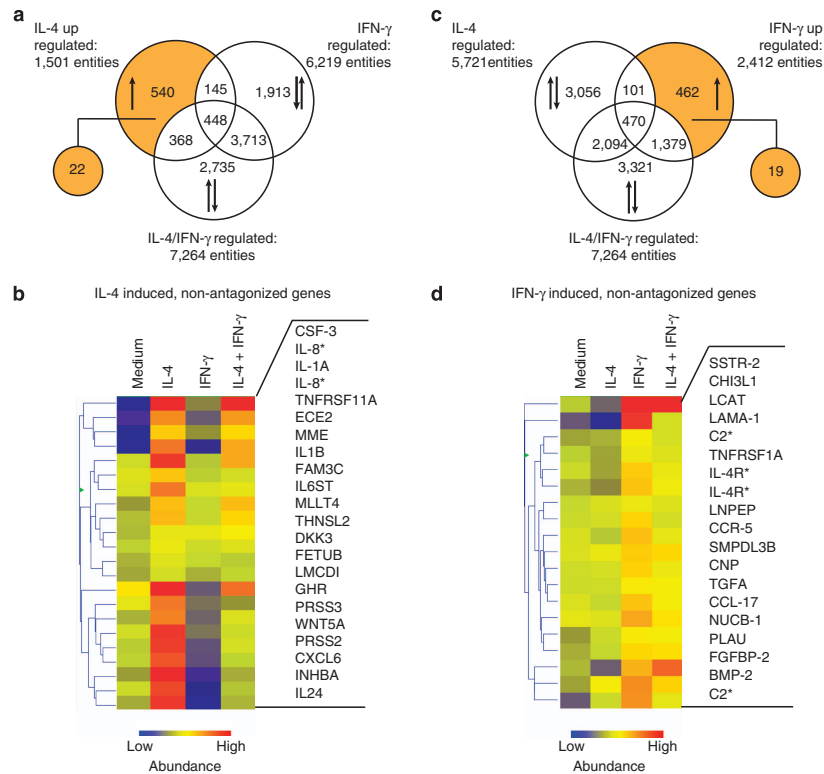


**Figure 1** Interleukin-4 (IL-4) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) antagonistic gene regulation. Normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) were cultured in the presence of IL-4 or IFN- $\gamma$  or IL-4 and IFN- $\gamma$  for 6 h to study RNA whole transcriptome by array technology. (a) Comparison of 1,501 IL-4-upregulated entities, 3,782 IFN- $\gamma$ -downregulated entities, and 7,264 IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities in a Venn diagram. A cut set of 48 antagonistic regulated entities was identified. The analysis is based on cultures of six genetically independent NHBEs of healthy donors. (b) A hierarchical clustering analysis of genes upregulated in comparison with untreated cells (medium) was performed, resulting in three different clusters. Labeled are six most cited genes in each cluster. (c) Comparison of 4,213 IL-4-downregulated entities, 2,412 IFN- $\gamma$ -upregulated entities, and 7,264 IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities in a Venn diagram. A cut set of 70 antagonistic regulated entities was identified. (d) A hierarchical clustering analysis of genes upregulated by IFN- $\gamma$  in comparison with untreated cells (medium) was performed, resulting in two different clusters. Labeled are the most cited genes in each cluster, except cluster 3 that only contained five genes. The color code indicates the abundance of transcripts ranging from low (blue) to high (red). Asterisks indicate two isoforms that were present in the analysis.

and IFN- $\gamma$  downregulated genes (Supplementary Figure 3c). However, a closer look reveals that both groups carry predominantly if not entirely those genes that escape the statistical thresholds of IL-4 or IFN- $\gamma$  regulation, but that make it over these thresholds when an additive effect by the presence of both cytokines is generated. Among these entities are no genes with established immunoregulatory or epithelial function except SLC10A2 (sodium and bile channel) or RGS4 (G-protein regulator). Furthermore, a large number of not annotated genes were found (gene list in Supplementary Tables S4 and S5).

#### IL-4- and IFN- $\gamma$ -induced secreted gene products

In order to extract specifically IL-4-inducible genes, all IFN- $\gamma$ -regulated entities as well as all IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities were excluded from further analysis (Figure 2a). When IL-4-induced but not IFN- $\gamma$ -regulated genes (540 entities) were filtered for specific secreted gene products, 22 entities were identified by Gene Ontology (GO) terms (Figure 2a,b; gene list in Supplementary Table S6). This group contained genes such as *Wnt5a*, *CCL6*, or *IL24* (Figure 2b). The group IL-4-induced and IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated genes (368 entities, Figure 2a) contained among others *TNFAIP6*, *CLDN5*, and *POSTN* (gene list in Supplementary Table S7). Conversely, to

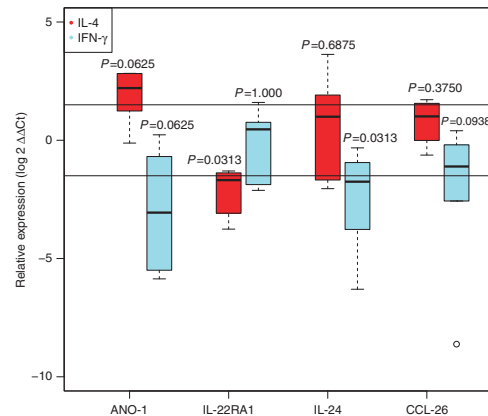


**Figure 2** Biomarker of T helper type 1/2 (Th1/Th2) imprinted airway epithelial cells. Normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) were cultured in the presence of interleukin-4 (IL-4) or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or IL-4 and IFN- $\gamma$  for 6 h to study RNA whole transcriptome by array technology. The analysis is based on cultures of six genetically independent NHBEs of healthy donors. **(a)** Comparison of 1,501 IL-4-upregulated entities, 6,219 IFN- $\gamma$ -regulated entities, and 7,264 IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities in a Venn diagram. A cut set of 540 IL-4 only-induced entities was identified within the groups of IL-4-upregulated entities. The identified genes were listed in a ranking according to current literature using the “Genomatix” software and Gene Ontology-Terms (GO-Terms) 0007267, 0005125, 0008009, and 0005615 for identification of biomarkers resulting in a list of 22 entities. **(b)** Hierarchical ranking of identified IL-4-induced secreted biomarkers. Asterisks indicate two isoforms that were present in the analysis. **(c)** Comparison of 5,721 IL-4-regulated entities, 2,412 IFN- $\gamma$ -upregulated entities, and 7,264 IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities in a Venn diagram. A cut set of 462 IFN- $\gamma$  only induced entities was identified within the groups of IFN- $\gamma$ -upregulated entities. A filter for the functions of the identified genes was listed by GO terms for identification of biomarkers resulting in a list of 22 entities. **(d)** Hierarchical ranking of identified IFN- $\gamma$ -induced secreted biomarkers. Asterisks indicate two isoforms that were present in the analysis. The color code indicates the abundance of transcripts ranging from low (blue) to high (red).

extract IFN- $\gamma$ -specific genes induced in airway epithelial cells, all IL-4-regulated entities as well as all IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities were excluded from analysis (**Figure 2c**). The remaining 462 IFN- $\gamma$ -induced entities were filtered for secreted gene products as described above and 19 entities were identified respectively by GO terms, including *CHI3L1* (*YKL-40*) and *CCL17* (**Figure 2c, d**; gene list in **Supplementary Table S8**). The group of IFN- $\gamma$ -induced and IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated genes (1,379 entities, **Figure 2c**) contained among others *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* (gene list in **Supplementary Table S9**). Several genes found to be significantly regulated by the array technology were validated real-time quantitative reverse transcription-PCR (**Figure 3**).

### Transcriptional mechanisms underlying IL4 and IFN- $\gamma$ antagonism in epithelial gene expression

Transcriptional antagonism and specifically the polarization of a transcriptional program are accompanied by direct counter-regulation of one transcription factor against the other as it is observed for *GATA3* and *TBX21* or *GATA3* and *FOXP3*.<sup>19</sup> As a result, a cellular phenotype may successively develop into either one or the other phenotype while sparing “in-between” phenotypes. To identify transcriptional regulators in this context, IL-4- or IFN- $\gamma$ -induced genes were filtered for transcriptional regulators in conjunction with either IL-4- or IFN- $\gamma$ -induced genes. Respectively, 80 and 102 entities were identified by GO terms and Genomatix curated



**Figure 3** Validation of *in vitro* gene expression changes. Normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) were cultured in the presence of interleukin-4 (IL-4) or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) for 6 h to study RNA expression by real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) confirming array results for *ANO1*, *IL22RA1*, *IL24*, and *CCL26*, expressed as log<sub>2</sub> gene expression changes ( $\Delta\Delta C_t$ ). The analysis is based on cultures of six genetically independent NHBEs of healthy donors. Data have been log<sub>2</sub> transformed to get a normal distribution, and the Shapiro test for normal distribution was performed. The genes are normally distributed on a 1% significance threshold.

annotations (Figure 4; gene list in Supplementary Tables S10 and S11). In the group of IL-4-induced transcriptional regulators, a group of 15 entities was identified containing *NFE2*, *GATA3*, *RARB*, *FoxQ1*, and *AhR* (Figure 4). We therefore analyzed whether *GATA3* and *TBX21* could potentially account for the antagonistic gene expression. It is interesting to note that *TBX21* and *GATA3* are also expressed in airway epithelial cells, and IL-4R $\alpha$ , STAT-6, and *GATA-3* are present in a majority of cells (Supplementary Figure S1 a-c). We performed a bioinformatics analysis of all antagonized gene products and conducted a pathway analysis based on transcription factor binding site involving literature evidence as well as predicted binding sites in respective promoters (Figure 5). The resulting network visualizes that *GATA3* could be interlinked with 38 genes, and *TBX21* could only be connected with 10 gene promoters. However, other IL-4- or IFN- $\gamma$ -induced transcription factors are frequently connected such as *Meis1*, *Hey2* that link with 23 or 38 IL-4-induced/IFN- $\gamma$ -antagonized genes, respectively, and *TEAD4* connecting with 36 IFN- $\gamma$ -induced/IL-4-antagonized genes (Supplementary Table S12).

#### Th1/Th2-specific gene expression changes *in vivo*

In order to show the physiologic relevance of identified genes under well-known Th2 conditions during allergic inflammation in nasal mucosa, allergic subjects sensitized for grass pollen and healthy controls were recruited. Nasal airway epithelial cells were obtained through nasal scrapings from the inferior turbinates. We refrained to obtain bronchial cells for

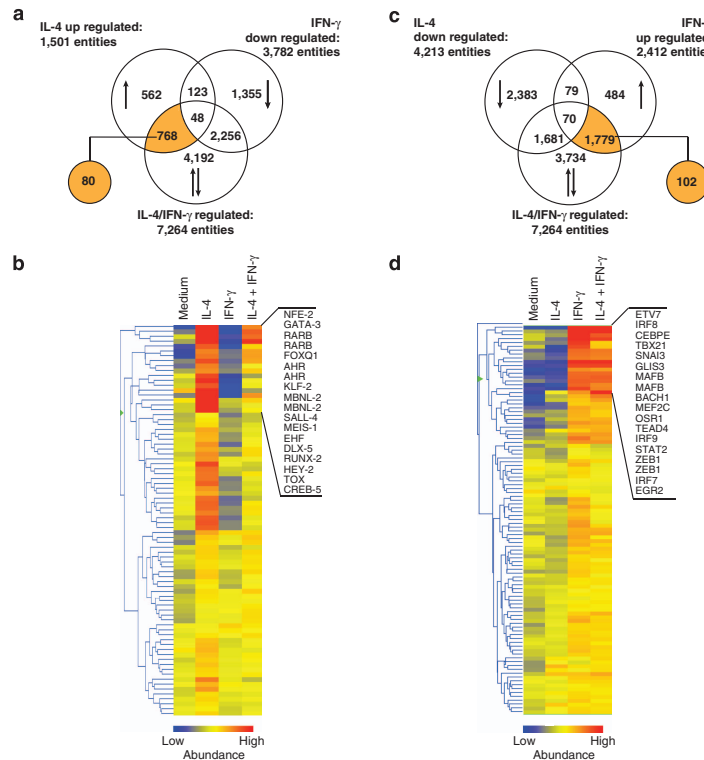
ethical reasons and instead used nasal epithelial cells (scrapings) on the basis of previous studies showing comparable regulation patterns of epithelial cells derived from upper vs. lower airways.<sup>20</sup> The scrapings were subjected to RNA isolation and real-time quantitative reverse transcription-PCR was performed for the prominent targets, in particular those that are secreted, and those known to be involved in transcriptional regulation in type 2 differentiation and disease: *IL7*, *IL24*, *IL18BP*, *IL22RA1*, *IL33*, *ANO1*, *IL1RL1* (*sST2*; *IL33R*), *AhR*, *GATA3*, *TBX21*, and *RUNX2* (Figure 6). Significant increased gene expression changes in allergic subjects in comparison with healthy control subjects were shown for *IL7* (log<sub>2</sub> expression change: 1.98, 1.57 to 5.33;  $P < 0.05$ ), *IL24* (log<sub>2</sub> expression change: 3.09, -1.12 to 4.02;  $P < 0.05$ ), *ANO-1* (log<sub>2</sub> expression change: 1.56, -0.18 to 3.79;  $P < 0.01$ ), *IL18BP* (log<sub>2</sub> expression change: 2.41, 1.84 to 3.23;  $P < 0.05$ ), *IL1RL1* (*sST2*, *IL33R*; log<sub>2</sub> expression change: 2.31, -0.42 to 4.78;  $P < 0.05$ ), *IL22RA1* (log<sub>2</sub> expression change: 1.02, -0.27 to 4.20;  $P < 0.05$ ), *AhR* (log<sub>2</sub> expression change: 1.08, 0.54 to 2.01;  $P < 0.05$ ), *GATA3* (log<sub>2</sub> expression change: 1.64, 0.67 to 3.18;  $P < 0.05$ ), and *RUNX2* (log<sub>2</sub> expression change: 1.35, 0.99 to 2.45;  $P < 0.05$ ). A trend for a decreased expression of *TBX21* was discovered in allergic subjects (log<sub>2</sub> expression change: -1.33, -3.47 to 0.92) compared with healthy control subjects. No significant changes were shown for the expression of *IL33* in allergic subjects (log<sub>2</sub> expression change: 1.57, 0.24 to 4.12) in comparison with healthy controls.

#### Biomarker of Th2-primed epithelial cells

Among the identified IL-4-induced, secreted gene products, IL-24 has to be highlighted as potential Th2 biomarker, as this protein belongs to the IL-10 superfamily. Currently, it is not described to be regulated by other epithelial activation processes such as *IL8* that is not only induced by IL-4 but also by IL-17. Western blot analysis was performed for IL-24 in supernatants of *in vitro* culture of NHBEs after stimulation with IL-4, IFN- $\gamma$ , and IL-4/IFN- $\gamma$  for 6 and 24 h (Figure 7a). IL-24 was detected at 6 and 24 h in IL-4-stimulated samples but not in medium control or IFN- $\gamma$ -subjected samples. As epithelial cells are able to secrete cytokines into the airway lumen, we hypothesized that IL-24 could also be detectable in nasal secretions. Therefore, secreted protein levels of nasal secretions of allergic asthma patients collected in and out of season were measured by electrochemiluminescence detection for IL-24 and compared with healthy controls. A significantly upregulated secretion of IL-24 was detected for patients in season (121.70 pg ml<sup>-1</sup>, 61.91–242.80;  $P < 0.01$ ) in comparison with healthy controls (49.33 pg ml<sup>-1</sup>, 31.98–71.13), whereas only a minor, nonsignificant increase of IL-24 was observed in the out-of-season group (93.85 pg ml<sup>-1</sup>, 28.15–145.40) compared with healthy controls (Figure 7b).

#### DISCUSSION

The objective of this study was to investigate whether IL-4 and IFN- $\gamma$  are subject to antagonistic gene regulation in airway epithelial cells. The study reveals a large number of

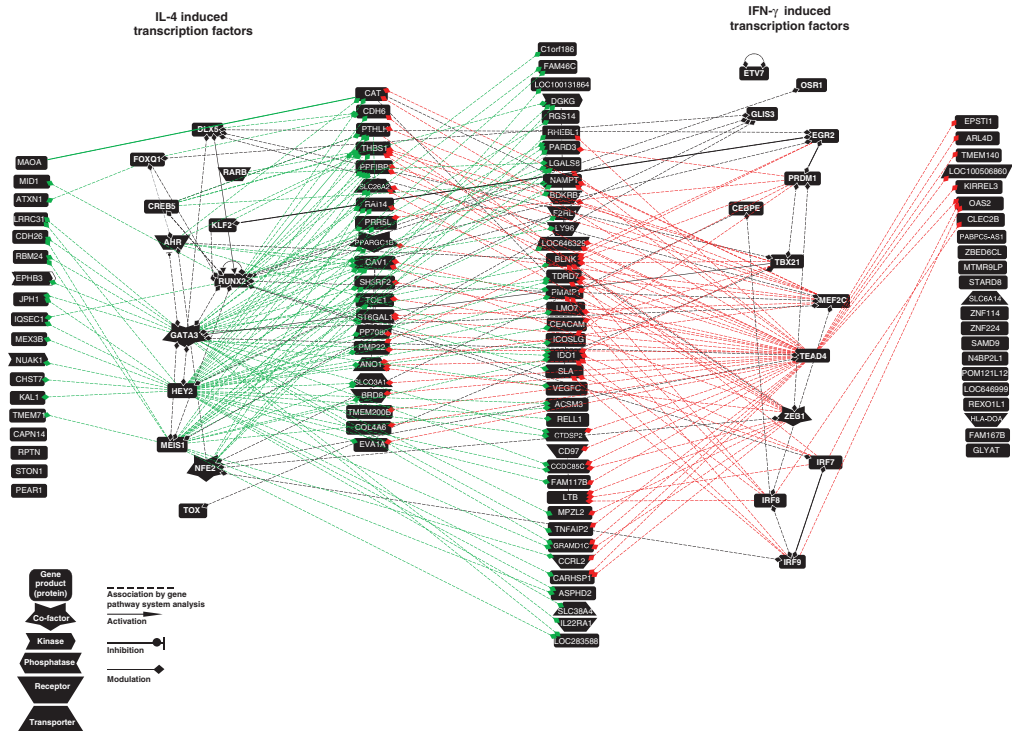


**Figure 4** Antagonistic transcriptional regulation. Normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) were cultured in the presence of interleukin-4 (IL-4) or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or IL-4 and IFN- $\gamma$  for 6 h to study RNA whole transcriptome by array technology. The analysis is based on cultures of six genetically independent NHBEs of healthy donors. **(a)** Comparison of 1,501 IL-4-upregulated entities, 3,782 IFN- $\gamma$ -downregulated entities, and 7,264 IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities in a Venn diagram. A cut set of 768 entities was identified within the groups of IL-4-upregulated and IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities. The identified genes were listed in a ranking according to current literature using the "Genomatix" software and Gene Ontology-Terms (GO-Terms) 0003676 and 0044212 for transcription factors resulting in a list of 80 entities. **(b)** Hierarchical ranking of identified IL-4-induced transcription factors, containing IL-4-master transcription factor GATA3. **(c)** Comparison of 4,213 IL-4-downregulated entities, 2,412 IFN- $\gamma$ -upregulated entities, and 7,264 IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities in a Venn diagram. A cut set of 1,779 entities was identified within the groups of IL-4-upregulated and IL-4/IFN- $\gamma$ -regulated entities. **(d)** Hierarchical ranking of identified IFN- $\gamma$ -induced transcription factors, containing IFN- $\gamma$ -master transcription factor TBX21. The color code indicates the abundance of transcripts ranging from low (blue) to high (red).

IL-4-induced and IFN- $\gamma$ -inhibited genes. In fact, IL-4-inducible genes of cluster 1 such as *CCL26* (Eotaxin-3), *ANO1*, or *RUNX2* are dampened in the presence of IFN- $\gamma$ . The example of *CCL26* is not only reproducing previous results that demonstrated that *CCL26* is an IL-4-inducible, proinflammatory chemokine in allergic rhinitis,<sup>21</sup> but also that epithelial chemokines can act as biomarkers for bullous pemphigoid and asthma with eosinophilic infiltration into the airways.<sup>21,22</sup> *ANO1* represents another example that has a major impact on basal and stimulated chloride conductance in airway epithelial cells<sup>23</sup> and serves as an indicator for epithelial proliferation and migration in the repair processes.<sup>24</sup> As this study shows that IFN- $\gamma$  inhibits *CCL26*-mediated chemotaxis and chloride conductance, it can be proposed that IFN- $\gamma$  may ameliorate eosinophilic infiltration and tracheal cartilage deposition as well as repair processes. This study reveals 46 additional

IL-4-inducible and IFN- $\gamma$ -inhibited genes that are yet not known to be under control of this IL-4-IFN- $\gamma$  antagonism. Most of these genes have not been implicated in Th2-driven diseases, except Calpain-14, a calcium-sensitive protease that together with TSLP is genetically associated with eosinophilic esophagitis.<sup>25</sup>

Conversely, genes of clusters 4 and 5 such as *IDO1* or *IL22RA1* were previously reported to be IFN- $\gamma$  inducible and are downregulated by IL-4. The IL-4-mediated suppression of *IDO1*, a potential mediator of tolerance, was previously observed in house dust mite-stimulated dendritic cell cultures.<sup>26</sup> Similarly, *IL22RA1* has been shown to be related to potentially tolerogenic downregulation of *MHCI* and *MHCII* in airway epithelial cells, and thus IL-4-mediated downregulation can also contribute to break tolerance.<sup>2,27</sup> Taken together, it appears that important genes are subject to



**Figure 5** Schematic illustration of the transcriptional network. Transcriptional network of interleukin-4 (IL-4; left) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induced transcription factors (right) and genes of the IL-4/IFN- $\gamma$  antagonism of epithelial cells. The network connects genes that are known to be transcriptionally regulated or that contain transcription factor binding sites (Genomatix database) of the respective factor. Green lines originate from IL-4- and red lines from IFN- $\gamma$ -induced transcription factors. Black lines show intertranscription factor connections. The figure shows numerous intertranscription factor lines that may be critical for polarized gene regulation. GATA3 appears to be connected to many type 2, and also several type 1 genes. On the side of IFN- $\gamma$ -induced transcription factors it appears that TEAD4, MEF2C, and ZEB1 have hub character, whereas TBX21 is connected with only a few genes.

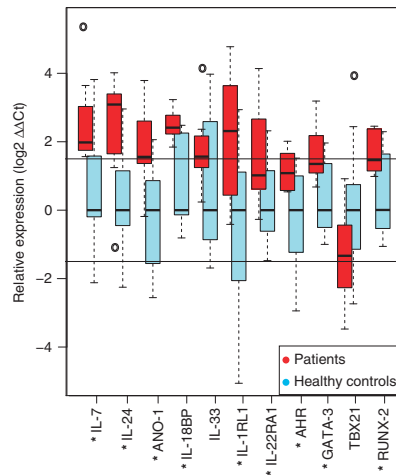
antagonistic regulation as it is known from T-cell differentiation and further substantiate the concept of IL-4 as tolerance breaking mediator that was previously demonstrated on the level of T cells.<sup>19</sup> Future studies are necessary to show that IL-4 counteracts tolerance also at the level of epithelial surfaces.

In contrast, the search for genes synergistically induced by IL-4 and IFN- $\gamma$ , but not by isolated cytokines, did not reveal strongly induced clusters. However, it is clear that there are numerous genes that are insensitive to antagonistic regulation. These nonantagonized genes are particularly interesting, as they may provide robust indicators for Th2-mediated immune responses, even if other, IFN- $\gamma$ -inducing inflammatory processes are disguising the pathology. Narrowing the view on genes that are secreted and detectable in secretions, 22 IL-4-induced genes were identified, including *CSF3*, *CXCL6*, *IL24*, and *WNT5a*. In addition, there is a small group of genes that is IL-4 induced and survives the presence of IFN- $\gamma$  in the co-culture situation, such as *TNFAIP6*, *CLDN5*, and *POSTN*, and all of these genes are known to be IL-4

regulated.<sup>28–30</sup> Conversely, IFN- $\gamma$  induced 19 genes with no influence of IL-4 such as *CHI3L1* (Chitinase-3-Like Protein 1 or YKL-40) that is known to be induced by IFN- $\gamma$  nasal epithelial cells.<sup>31</sup> Of note, there is also a considerable number of genes that are induced by IFN- $\gamma$  alone and regulated by the combination of IL-4 and IFN- $\gamma$ . In this group, IFN- $\gamma$  dominantly induces well-known IFN- $\gamma$ -responsive genes such as *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11*, whereas IL-4 has a neglectable effect.<sup>32</sup>

The physiological relevance of these antagonized and nonantagonized genes in human disease conditions was assessed in nasal scrapings of in-season allergic rhinitis patients and healthy subjects. On the basis of previous studies showing comparable regulation patterns of epithelial cells derived from upper vs. lower airways,<sup>20</sup> we anticipate that nasal scrapings containing mainly nasal epithelial cells provide an ethically appropriate surrogate biomarker source for validation of the targets identified in bronchial epithelial cells. *IL24* and *ANO1*, the latter a biomarker known from cystic fibrosis, are showing distinct expression in allergic patients during the allergy season

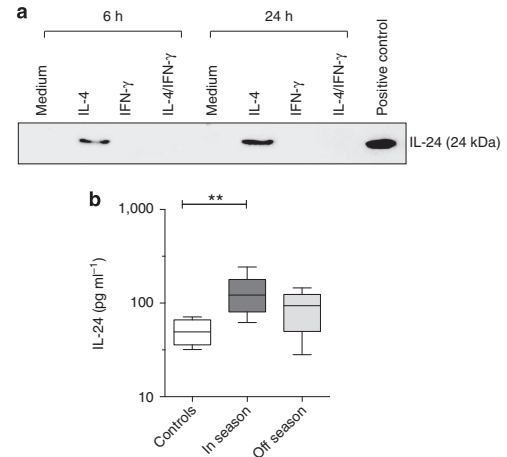




**Figure 6** Gene expression levels for selected transcripts. Nasal scrapings of asthmatic patients ( $n = 8$ ) as well as healthy controls ( $n = 12$ ) were subjected to RNA isolation and real-time quantitative reverse transcription–PCR (qRT-PCR) was performed. Gene expression changes ( $\Delta\Delta C_t$ ) have been  $\log_2$ -transformed to get a normal distribution. Significant differences could be shown for *IL7*, *IL24*, *ANO1*, *IL18BP*, *IL1RL1* (*sST2*; *IL33R*), *IL22RA1*, *AhR*, *GATA3*, and *RUNX2*.

but not in healthy individuals. In addition, the secreted protein levels of IL-24 showed a significant increase for patients in season compared with healthy controls, whereas this difference is lost out of the allergen season. Current studies are initiated to validate the IL-10 family member IL-24 in large cohorts and may provide assistance to physicians to use immunomodulatory drugs in the treatment of rhinitis in anticipation of a Th2 response, for example, in wheezing newborns or in conditions where the allergic impact is not certain.

The antagonistic nature of the IL-4 and IFN- $\gamma$  has been shown to depend on the crossregulation of *TBX21* and *GATA3* in lymphocyte differentiation. Both genes were previously detected in airway epithelial cells<sup>33</sup> and confirmed to be homogeneously expressed in NHBEs in this study along with other essential signaling components *IL4R $\alpha$*  and *STAT6* (**Supplementary Information** and data not shown, respectively). Based on this finding we considered that a transcription network is underlying epithelial response profile of *GATA3* and *TBX21*. Strikingly, all IL-4-inducible, *GATA3*-co-clustered genes were downregulated by IFN- $\gamma$ . *RUNX2* was previously described to be downregulated by IFN- $\gamma$  in mesenchymal stem cells, whereas its inducibility by IL-4 is unknown so far.<sup>34</sup> As *RUNX2* enhances TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling, it appears possible that IL-4 induction of *RUNX2* promotes airway remodeling.<sup>35</sup> IL-4 signaling was also shown to synergize with TGF- $\beta$  signaling that is enhancing the IL-4-inducible *FOXQ1* in alternatively (IL-4-) activated macrophages, also defined as “hidden type 2 inflammation”.<sup>36</sup>



**Figure 7** Interleukin-24 (IL-24) protein secretion *in vitro* and *in vivo*. (a) A signal for IL-24 secretion *in vitro* was detected by western blot analysis after 6 and 24 h of stimulation with IL-4 but not for interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or IL-4/IFN- $\gamma$  cultivation of normal human bronchial epithelial cells (NHBEs). There was no detectable signal in medium controls. (b) Significantly upregulated secretion of IL-24 of patients in season ( $n = 13$ ) in comparison with healthy controls ( $n = 14$ ) was detected. An increased secretion of IL-24 could be detected for both patient groups compared with healthy controls.

The IL-4-mediated induction of the *Aryl hydrocarbon receptor (AhR)* is confirming previous studies in B cells<sup>37</sup> and builds the bridge to the key function of *AhR* in inducing *IL22* (ref. 38,39) that in turn promotes epithelial repair mechanisms.<sup>40,41</sup> Furthermore, *AhR* is inhibiting *GATA3*,<sup>42</sup> and this could not only create a negative feedback loop, but also allow educt inhibition by IFN- $\gamma$ -induced IDO metabolites such as kynurenine.<sup>38,39,43</sup>

Besides the connection of *GATA3* to the *AhR*, *GATA3* interconnects with many other IL-4- and IFN- $\gamma$ -regulated genes, highlighting *GATA3* as hub gene, as it is known from the polarization network of T cells. *TBX21*, which is an equally important hub gene in T cells, is less interconnected in airway epithelial cells. In addition, the network analysis highlights that IL-4 also regulates hub genes *Meis1* and *Hey2* that are involved in transcriptional regulation of many genes, being a cofactor for *HOX* genes<sup>44</sup> and *HEY2* as a Notch-downstream target,<sup>42</sup> that in turn is known to regulate airway epithelial differentiation.<sup>43,45</sup> Future studies will have to confirm the role of these hub genes in the polarization of epithelial cells in Th2-driven diseases and airway remodeling.

Taken together, this study suggests that type 1-primed and type 2-primed airway epithelial cells exist and are pre-commissioned to respond along proallergic pathology. Future studies will need to define whether this behavior is epigenetically imprinted as it is the case for T cells and whether this knowledge can be used to exit proallergic disease conditions.

## METHODS

**Patients.** Healthy subjects ( $n = 12$ ) and allergic patients in season ( $n = 8$ ) aged between 20 and 65 years in good health (forced expiratory volume in one second  $1\% > 70\%$ ) with a history of clinically significant hay fever during the grass-pollen season since more than 2 years were included. Nasal scrapings were performed in the Allergy Section, Department of Otolaryngology, TUM School of Medicine (Munich, Germany). In addition, nasal secretions from healthy controls ( $n = 14$ ) and allergic and asthmatic patients in and out of season ( $n = 13$ ) were collected as previously described.<sup>46</sup> The full list of inclusion and exclusion criteria is available in the **Supplementary Information**. Each participant provided written informed consent. The study was approved by the local ethics committee.

**Cell culture.** Primary NHBs (Lonza, Walkersville, MD) of six genetically independent donors were grown as monolayers in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in serum-free defined growth media (BEGM, Lonza). NHBs (passage 3) were used at ~80% confluence in 6-well plates. To avoid gene expression changes or influences on the IL-4 or IFN- $\gamma$  signaling induced by growth factors in the BEGM medium, cells were rested in basal medium (BEBM) for 12 h, then stimulated with recombinant human IL-4 at 50 ng ml<sup>-1</sup> (R&D Systems, Minneapolis, MN) and human IFN- $\gamma$  at 10 ng ml<sup>-1</sup> (R&D Systems) in BEBM medium for 6 h at the indicated concentrations or medium alone or the same-time presence of both cytokines, IL-4 at 50 ng ml<sup>-1</sup> and IFN- $\gamma$  at 10 ng ml<sup>-1</sup>. For RNA analysis, harvested cells were lysed in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) containing 1%  $\beta$ -mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Germany) directly in the cell culture well. For western blot analysis, cells were cultured in the same conditions, but for 6 h and an additional 24 h time point.

**RNA isolation and whole genome microarray.** Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen) with on-column DNase digestion (Qiagen) for avoiding DNA contaminations. RNA quantification and quality assessments were performed by ultraviolet-visible spectrophotometry (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and the RNA 6000 Nano Chip Kit with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The RNA quality of all samples reached a RNA integrity number (developed by Agilent Technologies) of 9.1. Total RNA was amplified and Cy3 labeled by using the one-color Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. Hybridization to SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K Microarrays (Agilent Technologies) was performed with the Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies).

**Data analysis strategy.** Data analysis was performed using the Genespring Software GX 12.5 (Agilent Technologies) under minimal data reduction constraints (1.2-fold change and  $P \leq 0.05$  cutoff). Upon data import a standard baseline transformation to the median of all values was performed, including log transformation and computation of fold changes ( $\log_2(A/B) = \log_2(A) - \log_2(B)$ ). Subsequently, a principle component analysis was conducted and revealed a homogenous component distribution. Compromised array signals (array spot is nonuniform if pixel noise of feature exceeds threshold or above saturation threshold) were excluded from further analysis. These threshold settings were verified looking at genes known to be regulated by the stimuli, e.g., HLADRs for IFN- $\gamma$  or CCL-26 for IL-4.<sup>37</sup> Genes regulated more than 1.2-fold were further analyzed by using the paired Student's  $t$ -test and filtered for  $P$ -value ( $P < 0.05$ ) that represents a rather permissive threshold. The significantly regulated genes were summarized in entity lists (see **Supplementary Tables**). These entity lists were analyzed for overlaps using Venn diagrams. Manhattan cityblock on entities (Ward's linkage) was used to cluster changes in gene expression. The functions of the identified genes were listed according to current literature using the Genomatix software (Munich, Germany) and GO terms 0003676 and 0044212 for transcription factors and GO terms 0007267, 0005125, 0008009,

and 0005615 for identification of biomarkers. The gene expression network was generated using the Genomatix Pathway System (GePS) that integrates information extracted from public and proprietary databases to display canonical pathways or to create and extend networks based on literature data. Data displayed are focusing on binding sites of transcription factor families that were more than twofold regulated by IL-4 or IFN- $\gamma$  extracted from the transcriptome data sets.

**Reverse transcription and quantitative real-time PCR.** Isolated total RNA was subjected to reverse transcription using a high-capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR profiles were visualized using the commercially available FastStart Universal SYBR Green Mastermix (Roche, Basel, Suisse) and quantified by the ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The specific primers used in the real-time PCR are listed in **Supplementary Table S13**. The amount of *ANO-1*, *IL-22RA1*, *IL-24*, and *CCL-26* mRNA expression was normalized with endogenous control *18S*, *GAPDH*, and  $\beta$ -*actin* (housekeeping gene index,  $\Delta$ Ct values) and the relative quantification and calculation of range of confidence was performed using the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) method (relative gene expression) as previously described.<sup>2</sup> All amplifications were carried out at least in duplicate.

**Protein measurement by multi-array technology.** Protein levels of IL-24 in nasal secretions were detected in duplicates by MesoScaleDiscovery's (MSD) Multi-Array technology (MSD Mesoscale, Rockville, MD), a plate-based technology that enables the detection of biomarkers utilizing an electrochemiluminescence detection.

**Western blot analysis.** A Bradford assay was used to quantify amounts of protein concentrations of NHB culture supernatants to ensure that equal amounts were loaded per lane of the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (for details see **Supplementary Information**).

**Immunofluorescent staining of NHBs.** For immunofluorescent staining of NHBs of three genetically independent donors,  $15 \times 10^4$  cells were cultured on a sterilized, removable 12-well chamber (ibidi GmbH, Martinsried, Germany). At confluency of 50–60%, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at room temperature, followed by fixation with methanol, prechilled at  $-20$  °C and washed three times with phosphate-buffered saline. The primary antibody was diluted as 1:250 (IL-4R $\alpha$ , R&D, Abdingdon, UK) and added overnight at 4 °C in a humid chamber. When incubation was finished, cells were washed again three times with phosphate-buffered saline and incubated with diluted secondary antibody (goat anti-mouse AlexaFluor 488, 1:300 (Life Technologies, Waltham, MA) with added DAPI D1306 (Life Technologies) for 90 min at room temperature in a humid chamber. After incubation, cells were washed three times and slides were covered with coverslips (Schott glass, Mainz, Germany) using VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Slides were analyzed with LEICA confocal microscope (LEICA, Wetzlar, Germany).

**Statistical analysis.** Expression data of *in vitro* and *in vivo* gene expression have been log<sub>2</sub> transformed. One-sample Wilcoxon rank-sum tests were used to determine significant changes in expression of *in vitro* samples of the real-time PCR analysis (R Statistical Programming Language, Vienna, Austria). For *in vivo* data, two-sample Wilcoxon-rank sum tests were used to test for significant differences between control and patient samples. Samples of each group are summarized taking the median. The fold change has been computed to get absolute differences. Mann-Whitney tests were used to determine significant changes of protein levels in nasal secretions. Statistically significant differences were defined as  $P$  values  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , and  $***P < 0.001$ .

## ARTICLES

**SUPPLEMENTARY MATERIAL** is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/mi>

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the German Center for Lung Research (DZL).

### DISCLOSURE

CSW received support for research projects from PLS Design, LETI, Zeller AG and Allergopharma and accepted honoraria for consultancy and seminars from LETI, Allergopharma and Leo Pharma.

© 2015 Society for Mucosal Immunology

### REFERENCES

- Holgate, S.T. Epithelium dysfunction in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 1233–1244 (2007).
- Pennino, D. *et al.* IL-22 suppresses IFN-gamma-mediated lung inflammation in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 562–570 (2013).
- Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B. & Sander, M. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev. Cell.* **18**, 1022–1029 (2010).
- Cohn, L., Homer, R.J., Marinov, A., Rankin, J. & Bottomly, K. Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J. Exp. Med.* **186**, 1737–1747 (1997).
- Hurst, S.D. *et al.* New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J. Immunol.* **169**, 443–453 (2002).
- Liu, X. *et al.* Th2 cytokine regulation of type I collagen gel contraction mediated by human lung mesenchymal cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **282**, L1049–L1056 (2002).
- Akhabir, L. *et al.* Lung expression quantitative trait loci data set identifies important functional polymorphisms in the asthma-associated IL1RL1 region. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 729–731 (2014).
- Kamekura, R. *et al.* The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **42**, 218–228 (2012).
- Sagiani, S. *et al.* IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 676–685 (2013).
- Eickmeier, O. *et al.* Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* **50**, 152–157 (2010).
- Mollers, M. *et al.* Intracellular cytokine repertoire in different T cell subsets from patients with sarcoidosis. *Thorax* **56**, 487–493 (2001).
- Lopez-Maderuelo, D. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 970–975 (2003).
- Rosewich, M. *et al.* Airway inflammation in children and adolescents with bronchiolitis obliterans. *Cytokine* **73**, 156–162 (2015).
- Yamasaki, H., Ando, M., Brazer, W., Center, D.M. & Cruikshank, W.W. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* **163**, 3516–3523 (1999).
- Pawliczak, R. *et al.* Influence of IFN-gamma on gene expression in normal human bronchial epithelial cells: modulation of IFN-gamma effects by dexamethasone. *Physiol. Genomics* **23**, 28–45 (2005).
- LaPorte, S.L. *et al.* Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* **132**, 259–272 (2008).
- Tau, G. & Rothman, P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy* **54**, 1233–1251 (1999).
- Konno, S. *et al.* Interferon-gamma enhances rhinovirus-induced RANTES secretion by airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 594–601 (2002).
- Mantel, P.Y. *et al.* GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol.* **5**, e329 (2007).
- Braunstahl, G.J. *et al.* Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 469–476 (2001).
- Baumann, R. *et al.* Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. *Am. J. Rhinol. Allergy* **27**, 266–272 (2013).
- Gunther, C., Wozel, G., Meurer, M. & Pfeiffer, C. Up-regulation of CCL11 and CCL26 is associated with activated eosinophils in bullous pemphigoid. *Clin. Exp. Immunol.* **166**, 145–153 (2011).
- Jang, Y. & Oh, U. Anoctamin 1 in secretory epithelia. *Cell Calcium* **55**, 355–361 (2014).
- Ruffin, M. *et al.* Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 2340–2351 (2013).
- Rothenberg, M.E. Molecular, genetic, and cellular bases for treating eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology* **148**, 1143–1157 (2015).
- Maneechotesuwan, K. *et al.* Der p 1 suppresses indoleamine 2, 3-dioxygenase in dendritic cells from house dust mite-sensitive patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 239–248 (2009).
- Schmidt-Weber, C.B. Th1 7 and Treg cells innovate the TH1/TH2 concept and allergy research. *Chem. Immunol. Allergy* **94**, 1–7 (2008).
- Ueta, M., Mizushima, K., Yokoi, N., Naito, Y. & Kinoshita, S. Expression of the interleukin-4 receptor alpha in human conjunctival epithelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* **94**, 1239–1243 (2010).
- Dalmaso, A.P. *et al.* Interleukin-4 induces up-regulation of endothelial cell claudin-5 through activation of FoxO1: role in protection from complement-mediated injury. *J. Biol. Chem.* **289**, 838–847 (2014).
- Takayama, G. *et al.* Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 98–104 (2006).
- Park, S.J. *et al.* Increased expression of YKL-40 in mild and moderate/severe persistent allergic rhinitis and its possible contribution to remodeling of nasal mucosa. *Am. J. Rhinol. Allergy* **27**, 372–380 (2013).
- Sauty, A. *et al.* The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* **162**, 3549–3558 (1999).
- Chou, J., Provot, S. & Werb, Z. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it!. *J. Cell. Physiol.* **222**, 42–49 (2010).
- Duque, G. *et al.* Autocrine regulation of interferon gamma in mesenchymal stem cells plays a role in early osteoblastogenesis. *Stem Cells* **27**, 550–558 (2009).
- Zhang, X. *et al.* Runx2-Smad signaling impacts the progression of tumor-induced bone disease. *Int. J. Cancer* **136**, 1321–1332 (2015).
- Gratchev, A. *et al.* Novel monocyte biomarkers of atherogenic conditions. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 5859–5864 (2013).
- Tanaka, G. *et al.* Induction and activation of the aryl hydrocarbon receptor by IL-4 in B cells. *Int. Immunol.* **17**, 797–805 (2005).
- Brembilla, N.C. *et al.* In vivo dioxin favors interleukin-22 production by human CD4+ T cells in an aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent manner. *PLoS One* **6**, e18741 (2011).
- Zelante, T. *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**, 372–385 (2013).
- Eyerich, S., Eyerich, K., Cavani, A. & Schmidt-Weber, C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol.* **31**, 354–361 (2010).
- Eyerich, K. & Eyerich, S. Th22 cells in allergic disease. *Allergo J. Int.* **24**, 1–7 (2015).
- Negishi, T. *et al.* Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J. Immunol.* **175**, 7348–7356 (2005).
- Opitz, C.A. *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203 (2011).
- Bomgardner, D., Hinton, B.T. & Turner, T.T. 5' hox genes and meis 1, a hox-DNA binding cofactor, are expressed in the adult mouse epididymis. *Biol. Reprod.* **68**, 644–650 (2003).
- Niessen, K. & Karsan, A. Notch signaling in cardiac development. *Circ. Res.* **102**, 1169–1181 (2008).
- Dumitru, A.F. *et al.* Petasol butenolate complex (Ze 339) relieves allergic rhinitis-induced nasal obstruction more effectively than desloratadine. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1515–1521 (2011).

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2012). *Cellular and Molecular Immunology* (7th ed.): Elsevier Saunders.
- Abramson, M. J., Puy, R. M., & Weiner, J. M. (2010). Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*(8), CD001186. doi:10.1002/14651858.CD001186.pub2
- Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2003). Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current Opinion in Immunology*, 15(6), 627-633.
- Al-Muhsen, S., Johnson, J. R., & Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3), 451-462; quiz 463-454. doi:10.1016/j.jaci.2011.04.047
- Arvidsson, M. B., Lowhagen, O., & Rak, S. (2004). Allergen specific immunotherapy attenuates early and late phase reactions in lower airways of birch pollen asthmatic patients: a double blind placebo-controlled study. *Allergy*, 59(1), 74-80.
- Asher, M. I., & Weiland, S. K. (1998). The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. *Clinical and Experimental Allergy*, 28 Suppl 5, 52-66; discussion 90-51.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, 347(12), 911-920. doi:10.1056/NEJMra020100
- Barlogie, B., Raber, M. N., Schumann, J., Johnson, T. S., Drewinko, B., Swartzendruber, D. E., Gohde, W., Andreeff, M., & Freireich, E. J. (1983). Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Research*, 43(9), 3982-3997.
- Barnes, P. J. (1997). Current therapies for asthma. Promise and limitations. *Chest*, 111(2 Suppl), 17S-26S.
- Barnes, P. J., Chowdhury, B., Kharitonov, S. A., Magnussen, H., Page, C. P., Postma, D., & Saetta, M. (2006). Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(1), 6-14. doi:10.1164/rccm.200510-1659PP
- Bateman, E. D., Hurd, S. S., Barnes, P. J., Bousquet, J., Drazen, J. M., FitzGerald, M., Gibson, P., Ohta, K., O'Byrne, P., Pedersen, S. E., Pizzichini, E., Sullivan, S. D., Wenzel, S. E., & Zar, H. J. (2008). Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*, 31(1), 143-178. doi:10.1183/09031936.00138707

- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729.
- Baumann, R., Rabaszowski, M., Stenin, I., Tilgner, L., Scheckenbach, K., Wiltfang, J., Schipper, J., Chaker, A., & Wagenmann, M. (2013). Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. *Am J Rhinol Allergy*, 27(4), 266-272. doi:10.2500/ajra.2013.27.3913
- Bickerman, H. A., Sproul, E. E., & Barach, A. L. (1958). An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer. *Diseases of the Chest*, 33(4), 347-362.
- Birnbaum, H. G., Berger, W. E., Greenberg, P. E., Holland, M., Auerbach, R., Atkins, K. M., & Wanke, L. A. (2002). Direct and indirect costs of asthma to an employer. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(2), 264-270. doi:10.1067/mai.2002.121310
- Bisgaard, H., Zielen, S., Garcia-Garcia, M. L., Johnston, S. L., Gilles, L., Menten, J., Tozzi, C. A., & Polos, P. (2005). Montelukast reduces asthma exacerbations in 2- to 5-year-old children with intermittent asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(4), 315-322. doi:10.1164/rccm.200407-894OC
- Bobolea, I., Barranco, P., Del Pozo, V., Romero, D., Sanz, V., Lopez-Carrasco, V., Canabal, J., Villasante, C., & Quirce, S. (2015). Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy*, 70(5), 540-546. doi:10.1111/all.12580
- Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., & Vignola, A. M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(5), 1720-1745. doi:10.1164/ajrcm.161.5.9903102
- Braga, M., Quecchia, C., Cavallucci, E., Di Giampaolo, L., Schiavone, C., Petrarca, C., & Di Gioacchino, M. (2011). T regulatory cells in allergy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24(1 Suppl), 55S-64S.
- Braunstahl, G. J. (2007). The united airways concept: from bench to bedside. *Monaldi Archives for Chest Disease. Archivio Monaldi per Le Malattie Del Torace*, 67(2), 95-101. doi:10.4081/monaldi.2007.496
- Braunstahl, G. J., Overbeek, S. E., Kleinjan, A., Prins, J. B., Hoogsteden, H. C., & Fokkens, W. J. (2001). Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3), 469-476. doi:10.1067/mai.2001.113046
- Bundesärztekammer (BÄK), K. r. B. K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). . (2013). Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma – 2. Auflage. Retrieved from <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/asthma>
- Carbone, T., Nasorri, F., Pennino, D., Eyerich, K., Foerster, S., Cifaldi, L., Traidl-Hoffman, C., Behrendt, H., & Cavani, A. (2010). CD56highCD16-CD62L- NK cells accumulate

- in allergic contact dermatitis and contribute to the expression of allergic responses. *Journal of Immunology*, 184(2), 1102-1110. doi:10.4049/jimmunol.0902518
- Caudell, E. G., Mumm, J. B., Poindexter, N., Ekmekcioglu, S., Mhashilkar, A. M., Yang, X. H., Retter, M. W., Hill, P., Chada, S., & Grimm, E. A. (2002). The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *Journal of Immunology*, 168(12), 6041-6046.
- Chaker, A. M., Shamji, M. H., Dumitru, F. A., Calderon, M. A., Scadding, G. W., Makatsori, M., Jones, I., He, Q. A., Subramanian, K. K., Arm, J. P., Durham, S. R., & Schmidt-Weber, C. B. (2016). Short-term subcutaneous grass pollen immunotherapy under the umbrella of anti-IL-4: A randomized controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(2), 452-461 e459. doi:10.1016/j.jaci.2015.08.046
- Clement, L. T. (1992). Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *Journal of Clinical Immunology*, 12(1), 1-10.
- Cocks, B. G., de Waal Malefyt, R., Galizzi, J. P., de Vries, J. E., & Aversa, G. (1993). IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *International Immunology*, 5(6), 657-663.
- Commins, S., Steinke, J. W., & Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(5), 1108-1111. doi:10.1016/j.jaci.2008.02.026
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E., & Caligiuri, M. A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97(10), 3146-3151.
- Cruz, A. A., Popov, T., Pawankar, R., Annesi-Maesano, I., Fokkens, W., Kemp, J., Ohta, K., Price, D., Bousquet, J., & Committee, A. I. S. (2007). Common characteristics of upper and lower airways in rhinitis and asthma: ARIA update, in collaboration with GA(2)LEN. *Allergy*, 62 Suppl 84, 1-41. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01551.x
- Dahlen, S. E., Hedqvist, P., Hammarstrom, S., & Samuelsson, B. (1980). Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*, 288(5790), 484-486.
- Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., De Vries, J., & Romagnani, S. (1988). IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *Journal of Immunology*, 140(12), 4193-4198.
- Dembo, M., & Goldstein, B. (1980). A model of cell activation and desensitization by surface immunoglobulin: the case of histamine release from human basophils. *Cell*, 22(1 Pt 1), 59-67.
- Di Marco, F., Santus, P., & Centanni, S. (2011). Anxiety and depression in asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 17(1), 39-44. doi:10.1097/MCP.0b013e328341005f
- Djukanovic, R., Homeyard, S., Gratziou, C., Madden, J., Walls, A., Montefort, S., Peroni, D., Polosa, R., Holgate, S., & Howarth, P. (1997). The effect of treatment with oral

- corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(3), 826-832. doi:10.1164/ajrccm.155.3.9117012
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C. A., & Weill, J. C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature Immunology*, 10(12), 1292-1299. doi:10.1038/ni.1814
- Douwes, J., Gibson, P., Pekkanen, J., & Pearce, N. (2002). Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*, 57(7), 643-648.
- Drazen, J. M., Israel, E., & O'Byrne, P. M. (1999). Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *New England Journal of Medicine*, 340(3), 197-206. doi:10.1056/NEJM199901213400306
- Eckrich, J., Zissler, U. M., Serve, F., Leutz, P., Smaczny, C., Schmitt-Grohe, S., Fussbroich, D., Schubert, R., Zielen, S., & Eickmeier, O. (2016). Airway inflammation in mild cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. doi:10.1016/j.jcf.2016.05.016
- Eickmeier, O., Huebner, M., Herrmann, E., Zissler, U., Rosewich, M., Baer, P. C., Buhl, R., Schmitt-Grohe, S., Zielen, S., & Schubert, R. (2010). Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine*, 50(2), 152-157. doi:10.1016/j.cyto.2010.02.004
- Fagraeus, A. (1947). Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *Nature*, 159(4041), 499.
- Fahy, J. V. (2009). Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc*, 6(3), 256-259. doi:10.1513/pats.200808-087RM
- Fliege, H., Rose, M., Arck, P., Walter, O. B., Kocalevent, R. D., Weber, C., & Klapp, B. F. (2005). The Perceived Stress Questionnaire (PSQ) reconsidered: validation and reference values from different clinical and healthy adult samples. *Psychosomatic Medicine*, 67(1), 78-88. doi:10.1097/01.psy.0000151491.80178.78
- Forster, R. J., Bertoncello, P., & Keyes, T. E. (2009). Electrogenerated chemiluminescence. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 2, 359-385. doi:10.1146/annurev-anchem-060908-155305
- Francis, J. N., Till, S. J., & Durham, S. R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(6), 1255-1261.
- Furuzawa-Carballeda, J., Sanchez-Guerrero, J., Betanzos, J. L., Enriquez, A. B., Avila-Casado, C., Llorente, L., & Hernandez-Molina, G. (2014). Differential cytokine expression and regulatory cells in patients with primary and secondary Sjogren's syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*, 80(6), 432-440. doi:10.1111/sji.12224

- Gajewski, T. F., & Fitch, F. W. (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *Journal of Immunology*, *140*(12), 4245-4252.
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, *18*(5), 693-704. doi:10.1038/nm.2755
- Garraud, O., Mollis, S. N., Holland, S. M., Sneller, M. C., Malech, H. L., Gallin, J. I., & Nutman, T. B. (1999). Regulation of immunoglobulin production in hyper-IgE (Job's) syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *103*(2 Pt 1), 333-340.
- Gharib, S. A., Nguyen, E. V., Lai, Y., Plampin, J. D., Goodlett, D. R., & Hallstrand, T. S. (2011). Induced sputum proteome in healthy subjects and asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *128*(6), 1176-1184 e1176. doi:10.1016/j.jaci.2011.07.053
- Goodwin, R. D., Jacobi, F., & Thefeld, W. (2003). Mental disorders and asthma in the community. *Archives of General Psychiatry*, *60*(11), 1125-1130. doi:10.1001/archpsyc.60.11.1125
- Hadeiba, H., & Locksley, R. M. (2003). Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *Journal of Immunology*, *170*(11), 5502-5510.
- Hamelmann, E., Takeda, K., Schwarze, J., Vella, A. T., Irvin, C. G., & Gelfand, E. W. (1999). Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *21*(4), 480-489. doi:10.1165/ajrcmb.21.4.3659
- Hansel, T. T., & Walker, C. (1992). The migration of eosinophils into the sputum of asthmatics: the role of adhesion molecules. *Clinical and Experimental Allergy*, *22*(3), 345-356.
- Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (1999). Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *103*(2), 175-183. doi:10.1172/JCI5155
- Harris, D. P., Goodrich, S., Mohrs, K., Mohrs, M., & Lund, F. E. (2005). Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *Journal of Immunology*, *175*(11), 7103-7107.
- Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., & Lund, F. E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*, *1*(6), 475-482. doi:10.1038/82717
- Heinrich, J., Richter, K., Frye, C., Meyer, I., Wolke, G., Wjst, M., Nowak, D., Magnussen, H., & Wichmann, H. E. (2002). [European Community Respiratory Health Survey in Adults (ECRHS)]. *Pneumologie*, *56*(5), 297-303. doi:10.1055/s-2002-30699



- Henderson, W. R., Jr., Lewis, D. B., Albert, R. K., Zhang, Y., Lamm, W. J., Chiang, G. K., Jones, F., Eriksen, P., Tien, Y. T., Jonas, M., & Chi, E. Y. (1996). The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. *Journal of Experimental Medicine*, *184*(4), 1483-1494.
- Heydenreich, B., Bellinghausen, I., Konig, B., Becker, W. M., Grabbe, S., Petersen, A., & Saloga, J. (2012). Gram-positive bacteria on grass pollen exhibit adjuvant activity inducing inflammatory T cell responses. *Clinical and Experimental Allergy*, *42*(1), 76-84. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03888.x
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, *299*(5609), 1057-1061. doi:10.1126/science.1079490
- Hussaarts, L., van der Vlugt, L. E., Yazdanbakhsh, M., & Smits, H. H. (2011). Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *128*(4), 733-739. doi:10.1016/j.jaci.2011.05.012
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., & Hornbrook, M. M. (1966). Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *Journal of Immunology*, *97*(1), 75-85.
- Ishizaka, T., Ishizaka, K., Johansson, S. G., & Bennich, H. (1969). Histamine release from human leukocytes by anti-gamma E antibodies. *Journal of Immunology*, *102*(4), 884-892.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomdrik, M. (2005). *Immunologie* (Vol. 5th): Spektrum, akad. Verlag.
- Jatakanon, A., Lim, S., & Barnes, P. J. (2000). Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *161*(1), 64-72. doi:10.1164/ajrccm.161.1.9809100
- Jee, H. M., Choi, B. S., Kim, K. W., Sohn, M. H., Han, M. Y., & Kim, K. E. (2010). Increased B cell-activating factor (BAFF) level in the sputum of children with asthma. *Korean Journal of Pediatrics*, *53*(8), 795-800. doi:10.3345/kjp.2010.53.8.795
- Jeffery, P. K. (2001). Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *164*(10 Pt 2), S28-38. doi:10.1164/ajrccm.164.supplement\_2.2106061
- Jia, G., Erickson, R. W., Choy, D. F., Mosesova, S., Wu, L. C., Solberg, O. D., Shikotra, A., Carter, R., Audusseau, S., Hamid, Q., Bradding, P., Fahy, J. V., Woodruff, P. G., Harris, J. M., Arron, J. R., & Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma Study, G. (2012). Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(3), 647-654 e610. doi:10.1016/j.jaci.2012.06.025
- Johansson, S. G., & Bennich, H. (1967). Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, *13*(4), 381-394.

- Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Ortega Martell, J. A., Platts-Mills, T. A., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., & Williams, H. C. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *113*(5), 832-836. doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591
- Johansson, S. G., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M., Wuthrich, B., & force, E. n. t. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, *56*(9), 813-824.
- Juniper, E. F., & Guyatt, G. H. (1991). Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis. *Clinical and Experimental Allergy*, *21*(1), 77-83.
- Juniper, E. F., Guyatt, G. H., Epstein, R. S., Ferrie, P. J., Jaeschke, R., & Hiller, T. K. (1992). Evaluation of impairment of health related quality of life in asthma: development of a questionnaire for use in clinical trials. *Thorax*, *47*(2), 76-83.
- Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N. J., Hense, G., Ruckert, B., Mantel, P. Y., Menz, G., Akdis, C. A., Blaser, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2004). Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *114*(6), 1425-1433. doi:10.1016/j.jaci.2004.07.014
- Katz, P. P., Yelin, E. H., Eisner, M. D., & Blanc, P. D. (2002). Perceived control of asthma and quality of life among adults with asthma. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, *89*(3), 251-258. doi:10.1016/S1081-1206(10)61951-5
- Kay, A. B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S. R., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., & Hamid, Q. (1991). Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Journal of Experimental Medicine*, *173*(3), 775-778.
- Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., & Lloyd, C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(11), 1539-1547. doi:10.1084/jem.20051166
- Kidney, J. C., Wong, A. G., Efthimiadis, A., Morris, M. M., Sears, M. R., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1996). Elevated B cells in sputum of asthmatics. Close correlation with eosinophils. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *153*(2), 540-544. doi:10.1164/ajrccm.153.2.8564094
- Kikuchi, T., Ishida, S., Kinoshita, T., Sakuma, S., Sugawara, N., Yamashita, T., & Koike, K. (2002). IL-6 enhances IgE-dependent histamine release from human peripheral blood-derived cultured mast cells. *Cytokine*, *20*(5), 200-209.

- Kim, J. M., Lin, S. Y., Suarez-Cuervo, C., Chelladurai, Y., Ramanathan, M., Segal, J. B., & Erekosima, N. (2013). Allergen-specific immunotherapy for pediatric asthma and rhinoconjunctivitis: a systematic review. *Pediatrics*, *131*(6), 1155-1167. doi:10.1542/peds.2013-0343
- Klein, U., Kuppers, R., & Rajewsky, K. (1997). Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*, *89*(4), 1288-1298.
- Kocalevent, R. D., Levenstein, S., Fliege, H., Schmid, G., Hinz, A., Brahler, E., & Klapp, B. F. (2007). Contribution to the construct validity of the Perceived Stress Questionnaire from a population-based survey. *Journal of Psychosomatic Research*, *63*(1), 71-81. doi:10.1016/j.jpsychores.2007.02.010
- Konig, K., Klemens, C., Eder, K., San Nicolo, M., Becker, S., Kramer, M. F., & Groger, M. (2015). Cytokine profiles in nasal fluid of patients with seasonal or persistent allergic rhinitis. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, *11*(1), 26. doi:10.1186/s13223-015-0093-x
- Korsgren, M., Erjefalt, J. S., Korsgren, O., Sundler, F., & Persson, C. G. (1997). Allergic eosinophil-rich inflammation develops in lungs and airways of B cell-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, *185*(5), 885-892.
- Korsgren, M., Persson, C. G., Sundler, F., Bjerke, T., Hansson, T., Chambers, B. J., Hong, S., Van Kaer, L., Ljunggren, H. G., & Korsgren, O. (1999). Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(3), 553-562.
- Krug, N., Hohlfeld, J. M., Kirsten, A. M., Kornmann, O., Beeh, K. M., Kappeler, D., Korn, S., Ignatenko, S., Timmer, W., Rogon, C., Zeitvogel, J., Zhang, N., Bille, J., Homburg, U., Turowska, A., Bachert, C., Werfel, T., Buhl, R., Renz, J., Garn, H., & Renz, H. (2015). Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. *New England Journal of Medicine*, *372*(21), 1987-1995. doi:10.1056/NEJMoa1411776
- Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R. C., Stolarski, B., Garcia, C. C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., McKenzie, A. N., Teixeira, M. M., Liew, F. Y., & Xu, D. (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergen-induced airway inflammation independent of IL-4. *Journal of Immunology*, *181*(7), 4780-4790.
- Kusaka, Y., Sato, K., Zhang, Q., Morita, A., Kasahara, T., & Yanagihara, Y. (1997). Association of natural killer cell activity with serum IgE. *International Archives of Allergy and Immunology*, *112*(4), 331-335.
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., & Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology*, *136*(12), 4480-4486.
- Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Jr., Tutt, M., & Kumar, V. (1986). Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *Journal of Immunology*, *137*(9), 2735-2739.

- LaPan, P., Brady, J., Grierson, C., Fleming, M., Miller, D., Sypek, J., & Fu, B. (2010). Optimization of total protein and activity assays for the detection of MMP-12 in induced human sputum. *BMC Pulmonary Medicine*, *10*, 40. doi:10.1186/1471-2466-10-40
- Leigh, T. R., Parsons, P., Hume, C., Husain, O. A., Gazzard, B., & Collins, J. V. (1989). Sputum induction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet*, *2*(8656), 205-206.
- Leonardo, S. M., De Santis, J. L., Gehrard, A., Malherbe, L. P., & Gauld, S. B. (2012). Expansion of follicular helper T cells in the absence of Treg cells: implications for loss of B-cell anergy. *European Journal of Immunology*, *42*(10), 2597-2607. doi:10.1002/eji.201242616
- Leonardo, S. M., Josephson, J. A., Hartog, N. L., & Gauld, S. B. (2010). Altered B cell development and anergy in the absence of Foxp3. *Journal of Immunology*, *185*(4), 2147-2156. doi:10.4049/jimmunol.1000136
- Leynaert, B., Neukirch, C., Kony, S., Guenegou, A., Bousquet, J., Aubier, M., & Neukirch, F. (2004). Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *113*(1), 86-93. doi:10.1016/j.jaci.2003.10.010
- Li, F., Yang, M., Wang, L., Williamson, I., Tian, F., Qin, M., Shah, P. K., & Sharifi, B. G. (2012). Autofluorescence contributes to false-positive intracellular Foxp3 staining in macrophages: a lesson learned from flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, *386*(1-2), 101-107. doi:10.1016/j.jim.2012.08.014
- Lindell, D. M., Berlin, A. A., Schaller, M. A., & Lukacs, N. W. (2008). B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PloS One*, *3*(9), e3129. doi:10.1371/journal.pone.0003129
- Loppow, D., Bottcher, M., Gercken, G., Magnussen, H., & Jorres, R. A. (2000). Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. *European Respiratory Journal*, *16*(2), 324-329.
- Ma, L., Xue, H. B., Guan, X. H., Shu, C. M., Wang, F., Zhang, J. H., & An, R. Z. (2014). The Imbalance of Th17 cells and CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) Treg cells in patients with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *28*(8), 1079-1086. doi:10.1111/jdv.12288
- Maarof, G., Bouchet-Delbos, L., Gary-Gouy, H., Durand-Gasselien, I., Krzysiek, R., & Dalloul, A. (2010). Interleukin-24 inhibits the plasma cell differentiation program in human germinal center B cells. *Blood*, *115*(9), 1718-1726. doi:10.1182/blood-2009-05-220251
- Makinde, T., Murphy, R. F., & Agrawal, D. K. (2006). Immunomodulatory role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in airway remodeling. *Current Molecular Medicine*, *6*(8), 831-841.
- Maloney, J., Bernstein, D. I., Nelson, H., Creticos, P., Hebert, J., Noonan, M., Skoner, D., Zhou, Y., Kaur, A., & Nolte, H. (2014). Efficacy and safety of grass sublingual

- immunotherapy tablet, MK-7243: a large randomized controlled trial. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 112(2), 146-153 e142. doi:10.1016/j.anai.2013.11.018
- Mamessier, E., Milhe, F., Guillot, C., Birnbaum, J., Dupuy, P., Lorec, A. M., Vervloet, D., & Magnan, A. (2007). T-cell activation in occupational asthma and rhinitis. *Allergy*, 62(2), 162-169. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01288.x
- Mathias, C. B. (2015). Natural killer cells in the development of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 15(2), 500. doi:10.1007/s11882-014-0500-2
- Mathias, C. B., Guernsey, L. A., Zammit, D., Brammer, C., Wu, C. A., Thrall, R. S., & Aguila, H. L. (2014). Pro-inflammatory role of natural killer cells in the development of allergic airway disease. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(4), 589-601. doi:10.1111/cea.12271
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., & Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 427(6972), 355-360. doi:10.1038/nature02284
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S. L., Sakaguchi, S., Takeda, K., Kurosaki, T., & Baba, Y. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, 41(6), 1040-1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016
- Matsushita, T., & Tedder, T. F. (2011). Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods in Molecular Biology*, 677, 99-111. doi:10.1007/978-1-60761-869-0\_7
- Miller, R. L., Eppinger, T. M., McConnell, D., Cunningham-Rundles, C., & Rothman, P. (1998). Analysis of cytokine signaling in patients with extrinsic asthma and hyperimmunoglobulin E. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(3), 503-511.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G., & Sakaguchi, S. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30(6), 899-911. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., & Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, 19, 197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136(7), 2348-2357.

- NETWORK, S. I. G. (2016). *British guideline on the management of asthma*. Edinburgh: SIGN.
- Nguyen, K. D., Vanichsarn, C., & Nadeau, K. C. (2009). Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> natural regulatory T cells in human allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(9), 823-833. doi:10.1164/rccm.200905-0761OC
- Normansell, R., Walker, S., Milan, S. J., Walters, E. H., & Nair, P. (2014). Omalizumab for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD003559. doi:10.1002/14651858.CD003559.pub4
- Nowak, D., Heinrich, J., Jorres, R., Wassmer, G., Berger, J., Beck, E., Boczor, S., Claussen, M., Wichmann, H. E., & Magnussen, H. (1996). Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *European Respiratory Journal*, *9*(12), 2541-2552.
- O'Byrne, P. M., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1987). Late asthmatic responses. *American Review of Respiratory Disease*, *136*(3), 740-751. doi:10.1164/ajrccm/136.3.740
- Olivenstein, R., Taha, R., Minshall, E. M., & Hamid, Q. A. (1999). IL-4 and IL-5 mRNA expression in induced sputum of asthmatic subjects: comparison with bronchial wash. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *103*(2 Pt 1), 238-245.
- Orihara, K., Narita, M., Tobe, T., Akasawa, A., Ohya, Y., Matsumoto, K., & Saito, H. (2007). Circulating Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell numbers in atopic patients and healthy control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*(4), 960-962. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.036
- Ouellet, K., Bacon, S. L., Boudreau, M., Plourde, A., Moullec, G., & Lavoie, K. L. (2012). Individual and combined impact of cigarette smoking, anxiety, and mood disorders on asthma control. *Nicotine Tob Res*, *14*(8), 961-969. doi:10.1093/ntr/ntr315
- Paggiaro, P. L., Chanez, P., Holz, O., Ind, P. W., Djukanovic, R., Maestrelli, P., & Sterk, P. J. (2002). Sputum induction. *European Respiratory Journal. Supplement*, *37*, 3s-8s.
- Park, S., Chung, H. S., Shin, D., Jung, K. H., Lee, H., Moon, J., & Bae, H. (2016). Adenovirus-mediated Foxp3 expression in lung epithelial cells reduces airway inflammation in ovalbumin and cockroach-induced asthma model. *Experimental and Molecular Medicine*, *48*(9), e259. doi:10.1038/emm.2016.83
- Pavia, D., Thomson, M. L., & Clarke, S. W. (1978). Enhanced clearance of secretions from the human lung after the administration of hypertonic saline aerosol. *American Review of Respiratory Disease*, *117*(2), 199-203.
- Pavkovic, M., Riefke, B., Gutberlet, K., Raschke, M., & Ellinger-Ziegelbauer, H. (2014). Comparison of the MesoScale Discovery and Luminex multiplex platforms for measurement of urinary biomarkers in a cisplatin rat kidney injury model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *69*(2), 196-204. doi:10.1016/j.vascn.2013.11.003

- Pellegrino, R., Viegi, G., Brusasco, V., Crapo, R. O., Burgos, F., Casaburi, R., Coates, A., van der Grinten, C. P., Gustafsson, P., Hankinson, J., Jensen, R., Johnson, D. C., MacIntyre, N., McKay, R., Miller, M. R., Navajas, D., Pedersen, O. F., & Wanger, J. (2005). Interpretative strategies for lung function tests. *European Respiratory Journal*, 26(5), 948-968. doi:10.1183/09031936.05.00035205
- Pham, T. H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G., & Cyster, J. G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity*, 28(1), 122-133. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.017
- Pin, I., Gibson, P. G., Kolendowicz, R., Girgis-Gabardo, A., Denburg, J. A., Hargreave, F. E., & Dolovich, J. (1992). Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 47(1), 25-29.
- Pitsios, C., Demoly, P., Bilo, M. B., Gerth van Wijk, R., Pfaar, O., Sturm, G. J., Rodriguez del Rio, P., Tsoumani, M., Gawlik, R., Paraskevopoulos, G., Rueff, F., Valovirta, E., Papadopoulos, N. G., & Calderon, M. A. (2015). Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy*, 70(8), 897-909. doi:10.1111/all.12638
- Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Leigh, R., Djukanovic, R., & Sterk, P. J. (2002). Safety of sputum induction. *European Respiratory Journal. Supplement*, 37, 9s-18s.
- Pleis, J. R., Lucas, J. W., & Ward, B. W. (2009). Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2008. *Vital and Health Statistics. Series 10: Data from the National Health Survey*(242), 1-157.
- Popov, T. A., Pizzichini, M. M., Pizzichini, E., Kolendowicz, R., Punthakee, Z., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1995). Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *European Respiratory Journal*, 8(4), 559-565.
- Postma, D. S., & Kerstjens, H. A. (1998). Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(5 Pt 3), S187-192. doi:10.1164/ajrcm.158.supplement\_2.13tac170
- Powell, C., Milan, S. J., Dwan, K., Bax, L., & Walters, N. (2015). Mepolizumab versus placebo for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*(7), CD010834. doi:10.1002/14651858.CD010834.pub2
- Quirce, S., Lemiere, C., de Blay, F., del Pozo, V., Gerth Van Wijk, R., Maestrelli, P., Pauli, G., Pignatti, P., Raulf-Heimsoth, M., Sastre, J., Storaas, T., & Moscato, G. (2010). Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy*, 65(4), 445-458. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02274.x
- Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R., & Nouri-Aria, K. T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1467-1472, 1472 e1461. doi:10.1016/j.jaci.2008.03.013

- Randolph, D. A., Stephens, R., Carruthers, C. J., & Chaplin, D. D. (1999). Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *104*(8), 1021-1029. doi:10.1172/JCI7631
- Ravensberg, A. J., Ricciardolo, F. L., van Schadewijk, A., Rabe, K. F., Sterk, P. J., Hiemstra, P. S., & Mauad, T. (2005). Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(4), 779-785. doi:10.1016/j.jaci.2004.11.045
- Richards, H., Williams, A., Jones, E., Hindley, J., Godkin, A., Simon, A. K., & Gallimore, A. (2010). Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology*, *131*(4), 583-592. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03333.x
- Ring, J., Bachert, C., Bauer, C.-P., & Czech, W. (2010). *Weißbuch Allergie Deutschland* (Vol. 3): SpringerMedizin, Urban&Vogel Verlag, München.
- Rogala, B., & Gluck, J. (2013). The role of interleukin-33 in rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, *13*(2), 196-202. doi:10.1007/s11882-013-0338-z
- Romagnani, S. (2002). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology*, *38*(12-13), 881-885.
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B., & Miller, J. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, *121*(18), 3599-3608. doi:10.1182/blood-2012-04-425397
- Ryttilä, P. H., Lindqvist, A. E., & Laitinen, L. A. (2000). Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, *15*(6), 1116-1119.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, *155*(3), 1151-1164.
- Schulze, J., Zissler U., Christmann, M., Rosewich, M., Zielen, S. (2011). Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) an IgE mediated disease? *Respiratory Medicine CME*, *4*(1), 33-34
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A., & Fazekas de St Groth, B. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(7), 1693-1700. doi:10.1084/jem.20060468
- Shim, J. U., & Koh, Y. I. (2014). Increased Th2-like Invariant Natural Killer T cells in Peripheral Blood From Patients With Asthma. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, *6*(5), 444-448. doi:10.4168/air.2014.6.5.444



- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., & Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology*, 3(2), 135-142. doi:10.1038/ni759
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E., & Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 380(6575), 630-633. doi:10.1038/380630a0
- Sidhu, S. S., Yuan, S., Innes, A. L., Kerr, S., Woodruff, P. G., Hou, L., Muller, S. J., & Fahy, J. V. (2010). Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14170-14175. doi:10.1073/pnas.1009426107
- Spiegel, J. M., & Paller, A. S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(6 Suppl), S118-127. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.033
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N., Mebius, R. E., Powrie, F., & Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews: Immunology*, 13(2), 145-149. doi:10.1038/nri3365
- Statistisches Bundesamt, D. (2000). Spezialbericht Allergie. Retrieved from <http://www.gbe-bund.de/gbe10/F?F=4446D>
- Steppuhn, H., Langen, U., Keil, T., & Scheidt-Nave, C. (2014). Chronic disease co-morbidity of asthma and unscheduled asthma care among adults: results of the national telephone health interview survey German Health Update (GEDA) 2009 and 2010. *Primary Care Respiratory Journal: Journal of the General Practice Airways Group*, 23(1), 22-29. doi:10.4104/pcrj.2013.00107
- Sur, S., Crotty, T. B., Kephart, G. M., Hyma, B. A., Colby, T. V., Reed, C. E., Hunt, L. W., & Gleich, G. J. (1993). Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *American Review of Respiratory Disease*, 148(3), 713-719. doi:10.1164/ajrccm/148.3.713
- Takayama, G., Arima, K., Kanaji, T., Toda, S., Tanaka, H., Shoji, S., McKenzie, A. N., Nagai, H., Hotokebuchi, T., & Izuhara, K. (2006). Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(1), 98-104. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.046
- The Global Asthma Network. (2014). The Global Asthma Report 2014. Auckland, New Zealand.
- Thomas, S. Y., Hou, R., Boyson, J. E., Means, T. K., Hess, C., Olson, D. P., Strominger, J. L., Brenner, M. B., Gumperz, J. E., Wilson, S. B., & Luster, A. D. (2003). CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *Journal of Immunology*, 171(5), 2571-2580.

- Togias, A. (2003). Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(6), 1171-1183; quiz 1184.
- Tomazic, P. V., Birner-Gruenberger, R., Leitner, A., Obrist, B., Spoerk, S., & Lang-Loidolt, D. (2014). Nasal mucus proteomic changes reflect altered immune responses and epithelial permeability in patients with allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *133*(3), 741-750. doi:10.1016/j.jaci.2013.09.040
- van de Veen, W., Stanic, B., Wirz, O. F., Jansen, K., Globinska, A., & Akdis, M. (2016). Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(3), 654-665. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.006
- van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Sollner, S., Akdis, D. G., Ruckert, B., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(4), 1204-1212. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.014
- van Kampen, V., de Blay, F., Folletti, I., Kobierski, P., Moscato, G., Olivieri, M., Quirce, S., Sastre, J., Walusiak-Skorupa, J., & Raulf-Heimsoth, M. (2013). EAACI position paper: skin prick testing in the diagnosis of occupational type I allergies. *Allergy*, *68*(5), 580-584. doi:10.1111/all.12120
- Varma, N., & Naseem, S. (2011). Application of flow cytometry in pediatric hematology-oncology. *Pediatric Blood & Cancer*, *57*(1), 18-29. doi:10.1002/pbc.22954
- Vlachos-Mayer, H., Leigh, R., Sharon, R. F., Hussack, P., & Hargreave, F. E. (2000). Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *European Respiratory Journal*, *16*(5), 997-1000.
- von Boehmer, H., Haas, W., & Jerne, N. K. (1978). Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(5), 2439-2442.
- von Mutius, E., Weiland, S. K., Fritsch, C., Duhme, H., & Keil, U. (1998). Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*, *351*(9106), 862-866. doi:10.1016/S0140-6736(97)10100-3
- Von Pirquet, C. (1946). Allergie. *Annals of Allergy*, *4*(5), 388-390.
- Walker, C., Checkel, J., Cammisuli, S., Leibson, P. J., & Gleich, G. J. (1998). IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation. *Journal of Immunology*, *161*(4), 1962-1969.
- Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., Chemin, K., Morel, Y., Dalod, M., Imbert, J., Pierres, M., Moretta, A., Romagne, F., & Vivier, E. (2007). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3384-3389. doi:10.1073/pnas.0609692104

- Weißflog. (2001). Epidemiologie und Kosten von Asthma bronchiale und chronischer Bronchitis in Deutschland. *DMW*.
- Williams, C. M., & Galli, S. J. (2000). Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(3), 455-462.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., & Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, *282*(5397), 2258-2261.
- Wjst, M., Dold, S., Roell, G., Reitmeir, P., Fritzsche, C., von Mutius, E., & Thiemann, H. H. (1994). Bronchial hyperreactivity and history of wheezing in children. *European Journal of Pediatrics*, *153*(9), 682-686.
- Woodruff, P. G., Boushey, H. A., Dolganov, G. M., Barker, C. S., Yang, Y. H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S. S., Dao-Pick, T. P., Pantoja, C., Erle, D. J., Yamamoto, K. R., & Fahy, J. V. (2007). Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15858-15863. doi:10.1073/pnas.0707413104
- Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia, G., Abbas, A. R., Ellwanger, A., Koth, L. L., Arron, J. R., & Fahy, J. V. (2009). T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(5), 388-395. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC
- Yu, N., Li, X., Song, W., Li, D., Yu, D., Zeng, X., Li, M., Leng, X., & Li, X. (2012). CD4(+)CD25(+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation*, *35*(6), 1773-1780. doi:10.1007/s10753-012-9496-8
- Yue, W. Y., & Cohen, S. S. (1967). Sputum induction by newer inhalation methods in patients with pulmonary tuberculosis. *Diseases of the Chest*, *51*(6), 614-620.
- Zeng, Z., Castano, A. R., Segelke, B. W., Stura, E. A., Peterson, P. A., & Wilson, I. A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science*, *277*(5324), 339-345.
- Zinkernagel, R. M., Althage, A., Cooper, S., Kreeb, G., Klein, P. A., Sefton, B., Flaherty, L., Stimpfling, J., Shreffler, D., & Klein, J. (1978). Ir-genes in H-2 regulate generation of anti-viral cytotoxic T cells. Mapping to K or D and dominance of unresponsiveness. *Journal of Experimental Medicine*, *148*(2), 592-606.
- Zissler, U. (2012). Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main*
- Zissler, U. M., Chaker, A. M., Effner, R., Ulrich, M., Guerth, F., Piontek, G., Dietz, K., Regn, M., Knapp, B., Theis, F. J., Heine, H., Suttner, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2016). Interleukin-4 and interferon-gamma orchestrate an epithelial polarization in the airways. *Mucosal Immunology*, *9*(4), 917-926. doi:10.1038/mi.2015.110

Zissler, U. M., Esser-von Bieren, J., Jakwerth, C. A., Chaker, A. M., & Schmidt-Weber, C. B. (2016). Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy*, *71*(4), 475-494. doi:10.1111/all.12828

## 8 Danksagung

Dr. Adam Chaker und Dr. Ulrich Zissler danke ich für die Erarbeitung des Themas, die unzählbaren Stunden an investierter Arbeit, ihr Interesse an der Weiterentwicklung meiner Person und der großartigen fachlichen und menschlichen Begleitung während der Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Carsten Schmidt-Weber für seine klare strukturelle Verknüpfung und Entwicklung des größeren Ganzen.

Dr. Ruth Neuhauser danke ich für die Motivation, die Unterstützung und Korrektur dieser Arbeit.

Ich danke zudem herzlich meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums unterstützt hat.

Nicht zu vergessen sind all die Kollegen im Labor und der Klinik, die immer aufmunternde Worte und Gedankenanstöße für mich hatten und mich bei dieser Arbeit begleiteten.