

Charakterisierung von γ/δ T-Zellen und NKT-like Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen

Marlene Winkler

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber
2. Priv.-Doz. Dr. Adam Chaker

Die Dissertation wurde am 19.09.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2023 angenommen.

Technische Universität München

Dissertation

Charakterisierung von γ/δ T-Zellen und NKT-like Zellen in
allergischen Atemwegserkrankungen

Danksagung

Zuallererst danke ich meinem Betreuer Dr. phil. nat. Ulrich Zissler, meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. med. Adam Chaker sowie meinem zweiten Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Carsten Schmidt-Weber sehr für ihre fachliche Betreuung, ihren persönlichen Einsatz und die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Meinen Eltern und meiner Schwester Laura gilt besonderer Dank für die Motivation und die Schärfung des Blickes auf das Wesentliche.

Bei meiner Doktorschwester Alexandra Kurz und meinen ehemaligen Kommiliton*innen und Freud*innen Lara, Uli, Mariam, Yacine und Sophia sowie Michi, Sebastian und Felix bedanke ich mich von Herzen für die gegenseitigen Durchhalteparolen und gemeinsamen Doktorarbeitsessions, die mir immer in schöner Erinnerung bleiben werden <3

Zuletzt mein größtes Dankeschön an meinen Freund Alexander, der während meiner gesamten – studentischen sowie beruflichen – Laufbahn meine größte Stütze und unauswechselbare Begleitung war.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	6
II. Abbildungsverzeichnis.....	9
III. Tabellenverzeichnis.....	13
IV. Zusammenfassung.....	14
1 Einleitung	16
1.1 Definition, Prävalenz und sozioökonomische Aspekte	16
1.2 Typ-I-Allergie, IgE-vermittelte Sofortreaktion.....	19
1.3 Allergische Rhinitis	22
1.4 Allergisches Asthma	23
1.5 One Airway, One Disease	24
1.6 Diagnostik.....	25
1.7 Therapie der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas.....	26
1.8 Grade der Asthmakontrolle.....	29
1.9 Allergenspezifische Immuntherapie.....	29
1.10 Blut und Sputum als Untersuchungsmatrices zur Detektion pathophysiologischer Prozesse.....	31
1.10.1 γ/δ T-Zellen	32
1.10.2 NKT-Zellen.....	33
2 Fragestellung	35
2.1 γ/δ T-Zellen und NKT Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen- ubi status.....	35
2.2 Zielsetzung	35
3 Methoden und Materialien.....	37
3.1 Hilfsmittel.....	37
3.1.1 Geräte	37
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	38
3.1.3 Programme	39
3.1.4 Reagenzien.....	39
3.1.5 Antikörper.....	41
3.2 Studienteilnehmer.....	41
3.2.1 Ethische Richtlinien.....	41
3.2.2 Charakterisierung des Studienzeitraums und der Probanden.....	42
3.2.3 Klinische Probengewinnung.....	44

3.3	Sputuminduktion.....	45
3.4	Blutentnahme	46
3.5	Aufbereitung des Sputums	46
3.6	Aufbereitung des Blutes	48
3.7	Zytospins (Sputum)	49
3.7.1	Herstellung.....	49
3.7.2	Färbung.....	49
3.7.3	Auszählung und Zytodifferenzierung.....	49
3.8	Durchflusszytometrische Analyse.....	50
3.8.1	FACS-Färbung der PBMCs (Blutzellen).....	50
3.8.2	FACS-Färbung von Sputumzellen	51
3.8.3	Kompensation	52
3.8.4	Antikörperwahl	52
3.8.5	Gatingstrategie Sputum	53
3.8.6	Gatingstrategie PBMCs	56
4	Ergebnisse	59
4.1	Statistische Auswertung	59
4.2	Klinische Daten.....	61
4.2.1	Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire - Vergleiche und Korrelationen.....	62
4.3	Zelldifferenzierung - Auswertung der Zytospins	65
4.4	Durchflusszytometrie Daten	66
4.4.1	Unterschiede zwischen den Matrices.....	66
4.4.2	Phänotypisierung von Sputumzellen in der Durchflusszytometrie.....	76
4.4.3	Korrelation von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen	85
5	Diskussion.....	88
5.1	Diskussion der Methoden	88
5.2	Diskussion der Ergebnisse	90
6	Anhang.....	109
6.1	T-Zellen in PBMCs	109
6.2	PBMCs: Korrelationen von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen.....	116
7	Literaturverzeichnis	119

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
A	Allergiker
AA	allergische Asthmatiker
AIT	allergenspezifische Immuntherapie
APZ	Antigen präsentierende Zellen
AR	allergische Rhinitiker
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALT	Bronchus-associated lymphatic tissue
CD	Cluster of Differentiation
CSF	Colony stimulating factor
DGAKI	Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ERS-Guidelines	European Respiratory Society
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAP	Facilitated antigen presentation
FASL	Fas Ligand
FEV1	Einsekundenkapazität / forced expiratory volume in 1 second
FMO	Fluorescence minus one
FVC	forcierte Vitalkapazität / forced vital capacity
GINA	Global Initiative for Asthma
H1/H2 Rezeptor	Histamin1/2 Rezeptor
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICS	inhalative Corticosteroide
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
INAH	intranasale Antihistaminika
INCS	intranasale Corticosteroide

INF	Interferon
i.s.	In-Season
KiGGS	Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland
LABA	Long-acting beta2-agonist
LAMA	Long-acting muscarinic-antagonist
LLN	Lower limit of normal
LTRA	Leukotrien-Rezeptor-Antagonist
MALT	Mucosa-associated lymphatic tissue
MHC	Major histocompatibility complex
miniRQLQ	Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire
NaCl	Natriumchlorid
NaN3	Natriumazid
NGO	Non-Governmental Organisation
NKG2D	Natural killer group 2D receptor
NKT-like Zellen	natürliche Killer-T-ähnliche Zellen
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
o.s.	Off-Season
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
rpm	Rounds per minute
SABA	Short-acting beta2-agonist
SARP	Severe Asthma Research Programm
SCIT	subkutane Immuntherapie
SEM	Standard error of the mean
SLIT	sublinguale Immuntherapie
SPT	Skin prick test
TCR	T-cell receptor
TGF β	Transforming growth factor β

TH-Zellen	T-Helferzelle
TNF	Tumor necrosis factor
Treg(s)	Regulatorische T-Zelle(n)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
WHO	World Health Organisation

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Atopischer Marsch – Mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Horak F., Pädiatrische Allergologie – Was gibt es Neues?, Clinicum Pneumo 2016, 2/16, mit freundlicher Genehmigung von Horak F. Abgerufen am 31.01.2022 https://medonline.at/175897/2016/paediatische-allergologie/ (Horak 2016)	17
Abbildung 2: Medikamentöses Stufenschema zur Langzeittherapie von Asthma für Erwachsene: Modifiziert nach der Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma, in Langfassung, 4. Auflage. Version 1. 2020. Abgerufen am 01.02.2022 www.asthma.versorgungsleitlinien.de . (Bundesärztekammer (BÄK) 2020)	28
Abbildung 3: Mechanismen der allergenspezifischen Immuntherapie – Modifiziert und ins Deutsche übersetzt nach Fujita H., Soyaka M. et al (2012), Mechanisms of allergen-specific Immunotherapy (Fujita et al. 2012a), Licensed under CC BY 2.0 https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ . Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395833/# on 25.01.2022 (Fujita et al. 2012b)	30
Abbildung 4: Regionaler Pollenflugkalender süddeutscher Raum - Quelle: Werchan, M., Werchan, B. & Bergmann, KC. (2018), Deutscher Pollenflugkalender 4.0: Update der regionalen Pollenflugkalender 4.0 mit Messdaten von 2011 bis 2016. Allergo J 28, 16–17 (2018). https://doi.org/10.1007/s15007-019-1887-9 ., mit freundlicher Genehmigung von M. Werchan. (Werchan, Werchan, and Bergmann 2018).....	42
Abbildung 5: Allgemeine Gatingstrategie, Sputum	54
Abbildung 6: Gatingstrategie: CD3+/CD5+ T-Zellen, CD25+ T-Zellen, Sputum	55
Abbildung 7: Gatingstrategie: γ/δ T-Zellen, CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen, CD56+ γ/δ T-Zellen, Sputum	55
Abbildung 8: Gatingstrategie: NKT-like Zellen, Sputum.....	56
Abbildung 9: Allgemeine Gatingstrategie, PBMCs.....	57
Abbildung 10: Gatingstrategie: CD3+/CD5+ T-Zellen, CD25+ T-Zellen, PBMCs	57
Abbildung 11: Gatingstrategie: γ/δ T-Zellen, CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen, CD56+ γ/δ T-Zellen, PBMCs	58
Abbildung 12: Gatingstrategie: NKT-like Zellen, PBMCs.....	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gatingstrategie.....	60
Abbildung 14: Sputumzellzahl pro ml	62
Abbildung 15: Ergebnisse des MiniRQLQ	63
Abbildung 16: Korrelation des MiniRQLQ mit der Anzahl [%] der eosinophilen Granulozyten im Sputum (Zytospins)	63
Abbildung 17: Korrelation MiniRQLQ in Summe mit IgE Leveln im Serum.....	64
Abbildung 18: Eosinophile Granulozyten im Sputum. Unterschiede zwischen In-Season und Off-Season und zwischen Kontrollen und Allergikern.....	66
Abbildung 19: Verteilung CD5+/CD3+ T-Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen.....	68

Abbildung 20: Verteilung CD25+ T-Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen	70
Abbildung 21: Verteilung von γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen	71
Abbildung 22: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, Kontrollen	72
Abbildung 23: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Rhinitiker ohne Immuntherapie.....	73
Abbildung 24: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Rhinitiker mit Immuntherapie	73
Abbildung 25: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Asthmatiker ohne Immuntherapie.....	74
Abbildung 26: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Asthmatiker mit Immuntherapie	74
Abbildung 27: Verteilung von NKT-like Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen.....	76
Abbildung 28: Gruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	77
Abbildung 29: Untergruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	78
Abbildung 30: Gruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	79
Abbildung 31: Untergruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	79
Abbildung 32: Gruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	80
Abbildung 33: Untergruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	81
Abbildung 34: Gruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	82
Abbildung 35: Untergruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	82
Abbildung 36: Gruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	83
Abbildung 37: Untergruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	84
Abbildung 38: Gruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	84
Abbildung 39: Untergruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum	85

Abbildung 40: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; alle Probanden	86
Abbildung 41: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; Kontrollen	86
Abbildung 42: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; A-AIT	87
Abbildung 43: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; A+AIT	87
Abbildung 44: Interaktionen von iNKT-Zellen mit Tregs und dendritischen Zellen – Modifiziert und ins Deutsche übersetzt nach Juno, J.A., Y. Keynan, and K.R. Fowke (2012), Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection, Licensed under CC BY 2.0 https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ . Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420949/ on 31.01.2022 (Juno, Keynan, and Fowke 2012b).....	107
Abbildung 45: Gruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	109
Abbildung 46: Untergruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	110
Abbildung 47: Gruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	110
Abbildung 48: Untergruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	111
Abbildung 49: Gruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	112
Abbildung 50: Untergruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	112
Abbildung 51: Gruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	113
Abbildung 52: Untergruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	113
Abbildung 53: Gruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	114
Abbildung 54: Untergruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	114
Abbildung 55: Gruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	115
Abbildung 56: Untergruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs	116
Abbildung 57: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; alle Probanden	117
Abbildung 58: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; Kontrollen	117

Abbildung 59: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; A-AIT	118
Abbildung 60: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; A+AIT	118

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Jährliche sozio-ökonomische Kosten durch nicht therapierte allergische Erkrankungen in der EU (Zuberbier et al. 2014)	19
Tabelle 2: Grad der Asthmakontrolle - Vereinfachtes Schema zur Messung der Asthmakontrolle gemäß GINA ((GINA)).....	29
Tabelle 3: Geräte	37
Tabelle 4: Materialien	38
Tabelle 5: Programme	39
Tabelle 6: Reagenzien.....	39
Tabelle 7: Antikörper	41
Tabelle 8: Gruppeneinteilung.....	43
Tabelle 9: Inhalationslösungen	45
Tabelle 10: Oberflächenmarker und ihre Funktion, Quelle: (Immunologie 2018).....	52
Tabelle 11: Klinische Daten und Sputumzellzahl / ml (Mean ± SEM)	61
Tabelle 12: Zytospins - Zellverteilung im Sputum bei Kontrollen und Allergikern; In-Season und Off-Season	65
Tabelle 13: Normwerte für Zellverteilung im Sputum (Zissler 2012)	65
Tabelle 14: Mittelwerte und SEM aller Probanden, errechnet für In- und Off-Season	67

IV. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der durchflusszytometrischen Charakterisierung von γ/δ T-Zellen und NKT-like Zellen aus induziertem Sputum und PBMCs im Kontext allergischer Atemwegserkrankungen.

γ/δ T-Zellen und NKT-Zellen haben Schnittstellenfunktionen zwischen adaptiver und innater Immunantwort inne. Ihre Anreicherung in der Lunge als immunologische Grenzfläche sowie die Tatsache, dass beide Zellarten allergischer Individuen durch Pollenbestandteile stimuliert werden können, implizieren ihre Beteiligung an der Immunopathologie allergischer Atemwegserkrankungen. Die Rolle von γ/δ T-Zellen und NKT-Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen, ihre komplexen Funktionen inkludierend, ist noch nicht abschließend geklärt und wird teils kontrovers diskutiert.

Als Allergie bezeichnet man eine spezifische, immunologisch vermittelte und pathogene Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems gegenüber Umweltstoffen. Allergische Rhinitis und allergisches Asthma sind in Deutschland mit 15,6% bzw. 8,7% die atopischen Erkrankungen mit der höchsten Lebenszeitprävalenz, welche die Lebensqualität Betroffener mitunter stark beeinträchtigen können. Die allergenspezifische Immuntherapie (AIT) bewirkt durch wiederholten Allergenkontakt die Induktion von Immuntoleranz und ist bis heute die einzige krankheitsmodifizierende Therapiemöglichkeit von Allergien.

In dieser Arbeit erfolgte innerhalb eines Jahres während (In-Season) und außerhalb (Off-Season) der Gräserpollenflug-Saison die durchflusszytometrische Charakterisierung von folgenden T-Zell-Subpopulationen: NKT-like Zellen, γ/δ T-Zellen; CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen, CD25+ T-Zellen. Zu diesem Zweck wurden die aus Blut und Sputum gewonnenen Zellen mithilfe von acht gegen verschiedene Oberflächenmarker der Zellen gerichteten Antikörpern gefärbt und anschließend analysiert. Dies ermöglichte die Exploration immunologischer Unterschiede auf systemischer und lokaler Ebene des Entzündungsgeschehens. Zusätzlich erfolgte auch die Erhebung von klinischen Daten (MiniRQLQ, Lungenfunktionstest) und die Messung von allergisch-entzündlichen Parametern (IgE, eosinophile Granulozyten).

In-Season nahmen 57 und Off-Season 55 Probanden an unserer Studie teil. Diese unterteilten sich in Kontrollprobanden (n=21 i.s./21 o.s.), allergische Rhinitiker ohne Immuntherapie (n=12 i.s./11 o.s.), allergische Rhinitiker mit Immuntherapie (n=11

i.s./10 o.s.), allergische Asthmatiker ohne Immuntherapie (n=7 i.s./7 o.s.) und allergische Asthmatiker mit Immuntherapie (n=6 i.s./6 o.s.).

Insgesamt hat sich gezeigt, dass Sputum in Bezug auf allergische Atemwegserkrankungen einen hohen Stellenwert besitzt. Folgende T-Zell-Subpopulationen zeigten einen höheren prozentualen Anteil im Sputum als in den PBMCs: CD25+ T-Zellen (9,8 -fach), γ/δ T-Zellen (72,9-fach), CD27- γ/δ T-Zellen (2-fach) und NKT-like Zellen (15,3-fach).

Der Effekt von allergenspezifischer Immuntherapie auf NKT-like Zellen und γ/δ T-Zellen ist im Sputum sichtbar und lässt Rückschlüsse auf einen regulatorischen Einfluss auf diese Zellreihen zu. Wir konnten einen statistisch signifikanten Effekt hinsichtlich der Immuntherapie in der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen NKT-like und CD25+ T-Zellen im Sputum zeigen, aufgrund dessen wir auf eine Aufhebung des in der Literatur beschriebenen zytotoxischen Effekts der NKT-like Zellen auf CD25+ T-Zellen in Allergikern durch die Immuntherapie schließen. Die Interaktion zwischen NKT-Zellen und regulatorischen T-Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen ist besonders in Bezug auf die durch Immuntherapie expandierenden regulatorischen T-Zellen von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden unseren Wissen nach zum ersten Mal aus Sputum gewonnene humane CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen im Setting allergischer Atemwegserkrankungen untersucht. Die in der Literatur beschriebene duale Rolle von γ/δ T-Zellen weist auf funktionell unterschiedliche Subpopulationen hin. Wir konnten CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen im Sputum nachweisen und somit zwei Subpopulationen der γ/δ T-Zellen beschreiben, welche aufgrund ihres Verteilungsmuster zwischen den Kohorten und in Verbindung mit dem aktuellen Wissensstand der Forschung auf einen „proallergischen“ CD27- und einen „antiallergischen“ CD27+ Phänotyp der γ/δ T-Zellen schließen lassen.

1 Einleitung

Immuntoleranz gegenüber körpereigenen und harmlosen Antigenen ist eine der Schlüsselfunktionen unseres Immunsystems und bewahrt uns vor chronischen Entzündungen und Gewebeschäden. Hierbei spielen viele verschiedene Zellarten und regulatorische Mediatoren eine Rolle. Es besteht ein sensibles Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen. Kommt dieses Gleichgewicht durcheinander, können sowohl allergische Erkrankungen als auch eine Vielzahl anderer Erkrankungen die Folge sein.

1.1 Definition, Prävalenz und sozioökonomische Aspekte

Unter Allergie versteht man eine spezifische, immunologisch vermittelte, krank machende Überempfindlichkeit gegenüber harmlosen Antigenen aus der Umwelt. Diese werden als Allergene bezeichnet und lösen bei sensibilisierten Personen typische, mit entzündlichen Prozessen einhergehende, Symptome aus.

Allergien werden anhand ihres Pathomechanismus nach Coombs und Gell (1963) in vier verschiedene Typen eingeteilt: Typ-I-Allergie (Sofort-Typ), Typ-II-Allergie (Zytotoxischer Typ), Typ-III-Allergie (Immunkomplex-Typ) und Typ-IV-Allergie (Spät-Typ) (Coombs and Gell 1963). Die Typ-I-Allergie vom Sofort-Typ ist IgE-vermittelt. Ihr sind auch die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma sowie die Anaphylaxie zuzuordnen (Murphy and Weaver 2018g).

Der Beginn von Allergien ist häufig früh z. B. im Kleinkindalter. Allergien verringern in ihrer chronischen Form zum Teil drastisch die Lebensqualität der Betroffenen. In Form von Berufserkrankungen – z. B. Berufsasthma oder Kontaktekzem – können sie auch eine Bedrohung für die Existenzgrundlage darstellen. In den schlimmsten Fällen akuter Verläufe, also beispielsweise beim Auftreten einer Anaphylaxie oder eines schweren Asthmaanfalls, können allergische Erkrankungen sogar einen letalen Ausgang haben (Klimek, Vogelberg, and Werfel 2019a).

Atopie bezeichnet die multigenetische Determination, bei aerogenem, okulärem, kutanem oder gastrointestinalem Kontakt mit Umweltstoffen mit einer erhöhten IgE-

Bildung zu reagieren. Zirka 50% der westlichen Weltbevölkerung sind für mindestens ein Umweltantigen sensibilisiert (Murphy and Weaver 2018g).

Atopie wird klinisch über einen positiven Skin-Prick-Test (SPT) definiert unabhängig vom Vorliegen allergischer Symptomatik. Atopie bezeichnet eine erhöhte Prädisposition des Organismus und sie ist kein Synonym für die Typ-I-Allergie, diese wiederum kann als klinische Manifestation der überwiegenden Typ 2 Immunantwort auf Umweltstoffe gesehen werden. Zu den klassischen atopischen Erkrankungen gehören das allergische Asthma, die allergische Rhinokonjunktivitis und die atopische Dermatitis. (Justiz Vaillant AA, Modi P, and A. 2022 Jul 8; Everson et al. 2015; Rouhos et al. 2008; Heinzerling et al. 2013)

Viele junge Patienten scheinen eine festgelegte „Allergikerkarriere“ zu haben. Die Entwicklung von Nahrungsmittelallergien, allergischem Asthma und allergischer Rhinokonjunktivitis auf dem Boden einer atopischen Dermatitis wird als „atopischer Marsch“ bezeichnet (Spergel and Paller 2003; Klimek, Vogelberg, and Werfel 2019a). Abbildung 1 zeigt die Prävalenz atopischer Erkrankungen sowie deren zeitliches Auftreten im Kindes- / Jugendalter (Horak 2016).

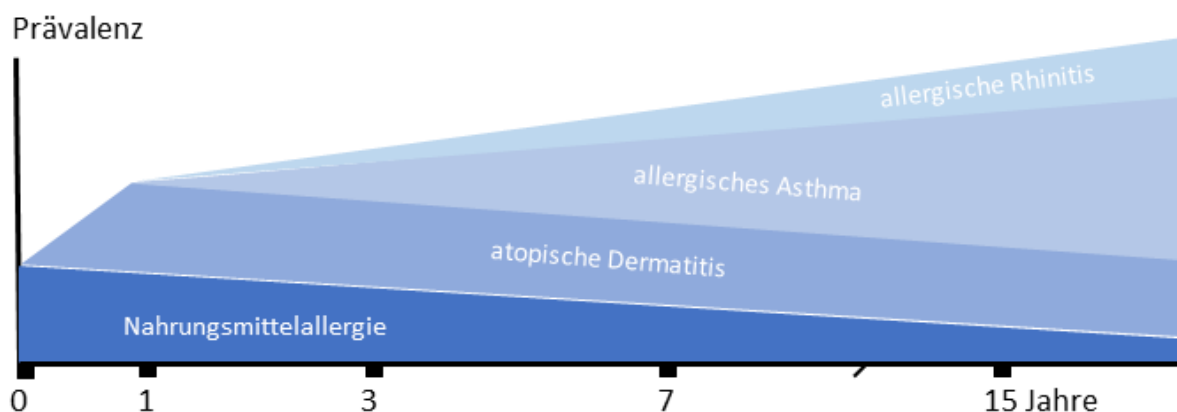


Abbildung 1: Atopischer Marsch – Mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Horak F., Pädiatrische Allergologie – Was gibt es Neues?, Clinicum Pneumo 2016, 2/16, mit freundlicher Genehmigung von Horak F. Abgerufen am 31.01.2022 <https://medonline.at/175897/2016/paediatrische-allergologie/> (Horak 2016)

Bei 22,9 % (95 %KI 22,0–23,7 %) aller Kinder wird im Alter zwischen 0-17 Jahren mindestens eine atopische Erkrankung festgestellt. Die Prävalenz in Deutschland betrug im Jahr 2007 laut KiGGS für 0- bis 17-Jährige 4,7 % für allergisches Asthma und 10,7% für allergische Rhinitis (Schlaud, Atzpodien, and Thierfelder 2007). Jungen unter 14 Jahren sind häufiger betroffen als Mädchen, bis zur Volljährigkeit gleicht sich diese Differenz jedoch aus (Thamm et al. 2018). Sind beide Eltern von Atopie

betroffen, hat das Kind ein Risiko von 40-60% eine IgE abhängige allergische Erkrankung zu entwickeln, bei nicht atopischen Eltern liegt das Risiko für das Kind bei nur 10% (Murphy and Weaver 2018g).

Allergische Rhinitis und allergisches Asthma sind mit 15,6 % bzw. 8,7 % die atopischen Erkrankungen mit der höchsten Lebenszeitprävalenz bei Erwachsenen. Aus sozioökonomischer Sicht stellen allergische Rhinitis, allergisches Asthma und Neurodermitis, aufgrund ihrer Häufigkeit und Verursachung direkter sowie indirekter Kosten, ein großes Problem dar. Direkte Kosten entstehen durch Medikation, ambulante Behandlung und Krankenhausaufenthalte, indirekte Kosten zum Beispiel durch Krankheitstage oder verminderte Arbeitsleistung. (Klimek, Vogelberg, and Werfel 2019b, c)

Eine Auswertung der statistischen Daten von Eurostat und Eurofound durch Zuberbier et al. zeigt, dass sich die indirekten Kosten in der EU auf 55 bis 151 Milliarden Euro pro Jahr belaufen. Dies entspricht jährlich 2.405 € pro unbehandelten allergischen Patienten. Durch eine adäquate Therapie würden sich bis zu 142 Milliarden Euro einsparen lassen – siehe Tabelle 1. (Zuberbier et al. 2014)

Tabelle 1: Jährliche sozio-ökonomische Kosten durch nicht therapierte allergische Erkrankungen in der EU (Zuberbier et al. 2014)

Jährliche sozioökonomische Kosten durch Abwesenheit und Präsentismus aufgrund nicht ausreichend therapierter allergischer Erkrankungen in der EU sowie potenzielle Ersparnisse durch adäquate Therapie			
	Angenommene Prävalenz relevanter allergischer Erkrankungen von 20%, 10% Beeinträchtigung	Angenommene Prävalenz relevanter allergischer Erkrankungen von 20%, 20% Beeinträchtigung	Angenommene Prävalenz relevanter allergischer Erkrankungen von 35%, 20% Beeinträchtigung
Jährliche Kosten pro Arbeitnehmer durch Abwesenheit	528 €	528 €	528 €
Jährliche Kosten pro Arbeitnehmer durch Präsentismus	845 €	1690 €	1690 €
Gesamte jährliche Kosten pro Arbeitnehmer	1373 €	2218 €	2218 €
Anzahl der Arbeitnehmer mit allergischen Erkrankungen	44 Millionen	44 Millionen	76 Millionen
Anzahl der Arbeitnehmer mit nicht adäquat therapierten allergischen Erkrankungen	40 Millionen	40 Millionen	68 Millionen
Gesamte allergiebedingte Kosten	54,9 Milliarden €	88,7 Milliarden €	150,8 Milliarden €
Zusätzliche Kosten durch Leitliniengerechte Therapie der bisher nicht adäquat Therapierten	5 Milliarden €	5 Milliarden €	8,5 Milliarden €
Gesamtes Einsparungspotential	50 Milliarden €	84 Milliarden €	142 Milliarden €

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung modifiziert und ins Deutsche übersetzt nach Zuberbier T, Lotvall J, Simoens S, Subramanian SV, Church MK. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA2LEN review. *Allergy* 2014; 69: 1275–1279.

1.2 Typ-I-Allergie, IgE-vermittelte Sofortreaktion

Die Allergie vom Sofort-Typ wird in zwei Phasen eingeteilt: die Sensibilisierungsphase und die Effektorphase. Erstere stellt die Grundlage für die zweite dar und ist somit essenziell für die Entwicklung von Allergien. Abhängig von Allergenen und Expositionsdauer können saisonale (z. B. Pollen) und perenniale (z. B. Hausstaubmilbe, Tierepithelien) Allergien unterschieden werden.

In der Sensibilisierungsphase nehmen in der Mucosa gelegene Antigenpräsentierende Zellen (Langerhanszellen und dendritische Zellen) Allergene auf und prozessieren diese zu Allergenfragmenten. In sekundär lymphatischen Organen, wie z. B. Lymphknoten, MALT (Mucosa-associated lymphatic tissue) bzw. BALT

(Bronchus-associated lymphatic tissue), werden die Allergenfragmente über MHC-Klasse-II CD4+ naiven T-Zellen präsentiert. Durch die unterschiedlichen Bedingungen im lymphatischen Gewebe können die naiven T-Zellen sich entweder zu Typ-1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) oder zu Typ-2-T-Helferzellen (TH2-Zellen) entwickeln. (Averbeck et al. 2007; Murphy and Weaver 2018g)

In einem von IL-12 und INF γ geprägten Zytokinmilieu entwickeln sich vorwiegend TH1-Zellen. Überwiegen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, wird die naive T-Zelle zur allergenspezifischen TH2-Zelle. (Murphy and Weaver 2018h)

Parallel dazu erfolgt die Antigenpräsentation über allergenspezifische B-Zellen, welche über den B-Zellrezeptor jeweils das dafür spezifische Allergen aufnehmen und es anschließend allergenspezifischen TH2-Zellen präsentieren (Murphy and Weaver 2018h). Zwischen allergenspezifischer TH2-Zelle und B-Zelle kommt es zu einer komplexen Interaktion. Allergenspezifische TH2-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den CD40-Liganden und produzieren u.a. IL-4 sowie IL-13, welche in der B-Zelle zum Immunglobulin-Klassenwechsel hin zu IgE führt. Die Folge dieser B-T-Zellinteraktion ist die Aktivierung der B-Zellen und konsekutive Bildung von B-Gedächtniszellen und Plasmazellen. (Murphy and Weaver 2018h; Averbeck et al. 2007)

Zusätzlich stimulieren IL-4, IL-13 und CD40-L in der B-Zelle die Expression des Oberflächenmoleküls CD23 (Fc ϵ RII) (Gould and Sutton 2008). Über eine Komplexbildung von CD23 mit IgE können B-Zelle Allergene aufnehmen und nach Prozessierung wiederum MHC-Klasse-II abhängig CD4+ T-Zellen präsentieren - man spricht von der IgE facilitated antigen presentation (IgE-FAP). Durch die IgE-FAP ist es möglich, dass jede CD23 tragende, aktivierte B-Zelle, ungeachtet ihrer Antigen- bzw. Allergenspezifität, als antigenpräsentierende Zelle für allergenspezifische TH2-Zellen fungieren kann. Durch diesen Mechanismus kommt es auch zum „epitope spreading“, durch welches immer mehr Epitope auf dem gleichen Allergen und schließlich auch andere Allergene erkannt werden. Dies ist vermutlich ursächlich für die Progression von einer singulären hin zu einer multiplen Sensibilisierung. Zusätzlich spielt CD23, welches sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Form vorkommt, eine wichtige Rolle für die Regulation der IgE Produktion. (Gould and Sutton 2008; Galli and Tsai 2012; Mudde, Bheekha, and Bruijnzeel-Koomen 1995)

In Atopikern führen die hohen IgE-Level durch die IgE-FAP dazu, dass bereits kleinste Allergendosen zu einer Aktivierung von TH2-Zellen über aktivierte B-Zellen führen können (Wilcock, Francis, and Durham 2006; van der Heijden, van Neerven, and Kapsenberg 1995).

Die allergenspezifischen TH2-Zellen sezernieren unter anderem Zytokine, welche zur Ausbildung und dem Erhalt der Allergie beitragen. Diese haben multiple Funktionen, von welchen hier nur einige im Rahmen der Typ-2-Immunität erwähnt seien: IL-4 führt zusätzlich zum IgE-Isotyp-Klassenwechsel auch zu einer weiteren TH2-Polarisierung (Murphy and Weaver 2018h). IL-5 spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Prussin and Metcalfe 2003). Eine wichtige Funktion von IL-13 im Rahmen der allergischen Reaktion ist die Steigerung der Mucusproduktion sowie Kontraktilität der glatten Muskulatur in den Atemwegen (Kondo et al. 2006; Chiba et al. 2009).

Plasmazellen, differenzierte B-Zellen, sezernieren allergenspezifisches IgE, welches an die hochspezifischen Oberflächenrezeptoren (FcεRI) von Mastzellen und basophilen Granulozyten sowie an APZ bindet. Es konnte gezeigt werden, dass lokal produziertes IgE sowohl einen allergieerhaltenden Effekt durch die Hochregulation des FcεRI Oberflächenrezeptors hat als auch zu einer verlängerten Lebensspanne der Mastzellen im Gewebe führt. (Smurthwaite et al. 2001; Macglashan 2005; Prussin and Metcalfe 2003)

Die Effektorphase, bei der IgE und Mastzellen eine Schlüsselfunktion innehaben, erfolgt nach der stattgefundenen Sensibilisierung und wird in eine Frühphase und eine Spätphase gegliedert. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es zu einer unmittelbaren Sofortreaktion.

Das Allergen bindet an die allergenspezifischen IgEs auf den Mastzellen und basophilen Granulozyten und bewirkt eine Quervernetzung („cross-linking“) dieser. Die dadurch aktivierten Mastzellen und basophilen Granulozyten setzen präformierte Entzündungsmediatoren aus zytoplasmatischen Granula frei. Histamin und andere Mastzellmediatoren bewirken eine erhöhte Gefäßpermeabilität, Vasodilatation, erhöhte Mucusproduktion und eine Kontraktion der glatten Muskulatur in Lunge bzw. Darm. Diese allergische Sofortreaktion tritt innerhalb weniger Sekunden bis Minuten ein und kann je nach Gewebe, auf welches das Allergen trifft, unterschiedlich ausfallen

(z. B. allergische Rhinokonjunktivits, allergisches Asthma, Urtikaria, Anaphylaxie). Anschließend an die Frühphase beginnt die sogenannte Spätphase, welche 2-12h nach dem Allergenkontakt und der initialen Mastzellaktivierung stattfindet. Vermittelt durch neu produzierte Zytokine, Lipidmediatoren und Wachstumsfaktoren aus den Mastzellen kommt es zu einer zellulären Reaktion. So führen z. B. IL-4 und IL-5 zur Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und weiterer TH2-Zellen. Die Freisetzung von u.a. Sauerstoffradikalen aus den toxischen Granula der rekrutierten und aktivierten eosinophilen Granulozyten induziert Gewebeschäden. Die Spätphase umfasst somit eine Vielzahl von Mechanismen, welche die Entzündung im Gewebe unterhalten und eine Chronifizierung bedingen. (Averbeck et al. 2007; Galli and Tsai 2012; Murphy and Weaver 2018h)

Marshall et al. haben für den komplexen Pathomechanismus der Allergie eine treffende Zusammenfassung gefunden. Laut ihnen sind allergische Erkrankungen die Folge einer systemischen immunologischen Dysfunktion mit lokalisierter oder auf ein Kompartiment beschränkter Manifestation (Marshall 2000).

1.3 Allergische Rhinitis

Die Nase erfüllt als Teil der oberen Atemwege eine wichtige Funktion für die Atmung, indem sie die Atemluft erwärmt und filtert. Durch diese Filterfunktion werden nicht nur die meisten Keime und Schmutzpartikel abgefangen, sondern auch ein Großteil der Allergene zurückgehalten. Die überbleibenden Allergene diffundieren durch die nasale Schleimhaut und lösen in sensibilisierten Individuen eine Typ-1-Reaktion aus. Das aus Mastzellen freigesetzte Histamin verursacht durch die Bindung an H-1 und H-2 Rezeptoren eine Vasodilatation und Permeabilitätsstörung der Gefäße, woraus eine Ödembildung resultiert (Guntinas-Lichius, Klußmann, and Lang 2021a). Durch die Stimulation sensorischer Nervenendigungen werden Schleimhypersekretion und Niesreiz ausgelöst. (Trautmann and Kleine-Tebbe 2017a) Durch verschiedene Mediatoren wie IL-4, IL-5 und IL-13 kommt es zur zellulären Infiltration der Nasenschleimhaut vor allem durch eosinophile Granulozyten, Steigerung der Mucusproduktion sowie Kontraktilität der glatten Muskulatur (Prussin and Metcalfe 2003; Murphy and Weaver 2018f; Guntinas-Lichius, Klußmann, and Lang 2021a; Kondo et al. 2006; Chiba et al. 2009).

Behinderte Nasenatmung, Juckreiz, Fließschnupfen und Niesen sind die Leitsymptome der allergischen Rhinitis. Kommen zusätzlich okuläre Symptome wie gerötete Augen, Tränen oder Juckreiz hinzu, spricht man von einer allergischen Rhinokonjunktivitis (Brozek et al. 2017). Die saisonale Rhinitis/Rhinokonjunktivitis wird auch als „Heuschnupfen“ bezeichnet. Häufige Allergene sind Gräser- und Baumpollen, die je nach Pollenflug wiederkehrende Symptomatik von Februar bis September auslösen. Die perenniale Rhinitis ist weniger häufig von okulären Symptomen begleitet und wird am häufigsten durch Hausstaubmilben, Tierepithelien und Schimmelpilze ausgelöst. Ähnlich wie beim allergischen Asthma kommt es auch bei der allergischen Rhinitis zu einer Hyperreaktivität der Schleimhaut. So können zum Beispiel auch nicht allergene Stäube oder Gerüche eine nasale Hyperreaktivität mit behinderter Nasenatmung auslösen. (Trautmann and Kleine-Tebbe 2017a)

Neben der Einteilung in saisonale und perenniale allergische Rhinitis, kann auch die Klassifikation nach ARIA mit den folgenden vier Untergruppen zur Anwendung kommen: milde intermittierende, mäßige/schwere intermittierende, milde persistierende, mäßige/schwere persistierende allergische Rhinitis (Bousquet et al. 2005).

1.4 Allergisches Asthma

Allergisches Asthma ist durch eine Hyperreaktivität der unteren Atemwege charakterisiert, welche mit einer Inflammation und erhöhter Bronchialsekretproduktion einhergeht. Schon 1860 definierte der englische Arzt und Dozent am King's College Henry Hyde Salter (1823-1871), seinerseits Asthmatiker, in seinem Buch "On asthma, it's pathology and treatment" Asthma als anfallsartige Luftnot von eigenartigem Charakter mit symptomfreien Intervallen (Sakula 1985; Salter 1860).

"Paroxysmal dyspnoea of a peculiar character, generally periodic with intervals of healthy respiration between the attacks." (Salter 1860)

Allergene gelangen durch Inhalation in die unteren Atemwege, wo sie durch die Schleimhaut diffundieren und bei sensibilisierten Individuen eine IgE-vermittelte Sofortreaktion auslösen. Durch Kontraktion der glatten Muskulatur, Schleimhautödem und vermehrte Schleimproduktion kommt es zur anfallsartigen, reversiblen Obstruktion der Bronchien. Die klassische Trias eines Asthmaanfalls besteht aus Atemnot, Husten

und expiratorischem Giemen. Die Symptomatik kann in Frequenz und Ausprägung durch virale Infekte der Atemwege, Rauchen oder Luftverschmutzung verschlechtert werden (Trautmann and Kleine-Tebbe 2017b).

Bei Asthmatikern kommt es bei Persistenz der allergischen Entzündung durch z. B. wiederholte oder permanente Allergenexposition zum sogenanntem „Airway-Remodeling“. Hierbei handelt es sich um eine, durch die chronische Entzündung und wiederholte Bronchokonstriktion bedingte, strukturelle Veränderung der Bronchien und Bronchiolen. Das Atemwegsepithel reagiert mit Hyperplasie der Becher-Zellen (mucusproduzierende Zellen) und dem Verlust von Zilien tragenden Zellen, was zu einer erhöhten Mucusproduktion und erschwerten zilliären Clearance führt. Zusätzlich werden vom Epithel Wachstumsfaktoren produziert, welche die Fibroblastenproliferation und Produktion von extrazellulärer Matrix weiter stimulieren, sodass es zur subepithelialen Fibrose und Verdickung der Basalmembran kommt. Die glatten Muskelzellen der bronchialen Schleimhaut zeigen eine Hyperplasie und Hypertrophie, was in einer schnelleren und effektiveren Konstriktion der Bronchien resultiert. Infolge der Entzündungsreaktion kommt es auch zur neuralen Beteiligung, welche durch einen Axon-Reflexmechanismus die neuromuskuläre bronchiale Hyperreaktivität bedingt (Hanf et al. 2003). Es entsteht eine erhöhte Empfindlichkeit der unteren Atemwege gegenüber verschiedenen Umweltreizen wie z. B. kalte Luft oder Gase, welche durch den Verlust der epithelialen Integrität noch weiter verstärkt wird. (Gillissen 2012; Galli, Tsai, and Piliponsky 2008; Grainge et al. 2011; Fehrenbach, Wagner, and Wegmann 2017; Murphy and Weaver 2018i)

Zusammenfassend resultiert aus dem Remodeling eine Verdickung der Bronchialwände mit verminderter Compliance (Lungendehnbarkeit) und eine hyperreagible und verstärkte Konstriktion, welche mit einer erhöhten Resistance (Atemwegswiderstand) einhergeht (Shifren et al. 2012; Kaminsky et al. 1997).

1.5 One Airway, One Disease

Bereits 1997 beschrieb Grossmann den Zusammenhang zwischen allergischer Rhinitis und allergischem Asthma mit den Worten “One Airway, One Disease” (Grossman 1997). Die bis dahin vorwiegend als zwei getrennt betrachteten Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege werden seither als funktionell und

immunologisch verbunden angesehen. So leiden etwa 70-90% der allergischen Asthmatiker zusätzlich an allergischer Rhinitis (Pite et al. 2014; de Groot et al. 2012). De Groot et al. konnten zeigen, dass eine zusätzlich bestehende allergische Rhinitis bei asthmatischen Kindern mit einer schlechteren medikamentösen Asthmakontrolle einhergeht. Nach Therapie der allergischen Rhinitis mittels nasal applizierten, topischen Kortikosteroiden konnte eine gute Asthmakontrolle erreicht werden (de Groot et al. 2012). Die Studiengruppe um Braunstahl konnte zeigen, dass eine nasale Provokation allergischer Rhinitiker eine generalisierte Atemwegsinfektion zur Folge hat (Braunstahl et al. 2001). Eine Studie von Amorim et al. zeigte des Weiteren, dass bei Asthmatikern die nasale Eosinophilie mit der Eosinophilie im Sputum korreliert (Amorim et al. 2010). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Typ-2-assoziierte Marker zwischen oberen und unteren Atemwegen korrelieren. Hier wurde von Zissler et al. gezeigt, dass vor allem IL-24, welches aus nasalem Sekret einfach zu gewinnen ist, einen vielversprechenden Kandidaten zum Monitoring der unteren Atemwege darstellt (Zissler et al. 2018).

Die ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) ist eine Initiative von Wissenschaftlern, die einen Paradigmenwechsel in der Nomenklatur und Therapie der allergischen Rhinitis initiiert hat. Diese NGO gibt in Zusammenarbeit mit der WHO internationale anwendbare Richtlinien zur Therapie von allergischen Atemwegserkrankungen aus (Klimek et al. 2019). Laut ARIA führt eine ausreichende Therapie der allergischen Rhinitis zu einer Reduktion der Asthmamedikation (Brozek et al. 2017).

1.6 Diagnostik

Zur Diagnosestellung des allergischen Asthmas werden verschiedene Kriterien herangezogen. Asthma gilt als gesichert bei Erfüllung aller folgenden Kriterien:

- typische Symptomatik (v.a. Atemnot, expiratorisches Giemen, trockener Husten bei/nach körperlicher Belastung)
- Nachweis einer Obstruktion in der Lungenfunktionstestung (Tiffeneau Index (FEV1/FVC) < LLN)

- komplette Reversibilität der Obstruktion durch Bronchodilatoren oder nach erfolgter antiasthmatischer Stufentherapie (s.u.)

Bei der Diagnosefindung der allergischen Rhinitis hat neben der klinischen Untersuchung die genaue Erhebung der Anamnese einen großen Stellenwert (Guntinas-Lichius, Klußmann, and Lang 2021b).

Zusätzlich muss die allergische Genese des Asthmas oder der Rhinitis auch diagnostisch gesichert werden. Dazu eignen sich Verfahren wie der Skin-Prick-Test, die Bestimmung des Gesamt-IgEs und spezifischen IgEs im Serum sowie ggf. allergenspezifische Organprovokationstestung. (NVL 2020, Bundesärztekammer (BÄK) 2020) (S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma, Buhl et al. 2017; (GINA) ; Bundesärztekammer (BÄK) 2020; Trautmann and Kleine-Tebbe 2017c)

1.7 Therapie der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas

Die ARIA gibt zur symptomatischen Therapie der allergischen Rhinitis folgende Empfehlungen ab: Bei saisonaler Rhinitis ist eine Therapie mit intranasalen Corticosteroiden (INCS) oder eine Kombination aus INCS mit oral applizierten H1-Antihistaminika empfohlen. Bei Bestehen einer perennialen Rhinitis hingegen wird nur die Monotherapie mit INCS empfohlen. Im Falle einer schweren saisonalen allergischen Rhinitis ist für einen schnellen Wirkungseintritt ein Kombinationspräparat aus INCS und intranasalen H1-Antihistaminika (INAH) der Monotherapie mit INCS vorzuziehen (Klimek et al. 2019; Bousquet et al. 2019).

Die symptomatische Therapie des allergischen Asthmas erfolgt nach einem festgelegten medikamentösen Stufenschema, welches 5 Stufen impliziert (siehe Abbildung 2). Je nach Grad der Asthmakontrolle kann die Therapiestufe deeskaliert oder eskaliert werden. Es besteht eine Empfehlung zur Langzeittherapie kombiniert mit einer Bedarfstherapie.

Die Bedarfsmedikation erfolgt in der Regel mit inhalativen, kurzwirksamen β 2-Sympathomimetika (SABA) oder ggf. mit niedrigdosiertem inhalativem Corticosteroid in Kombination mit Formoterol (LABA), wenn dieses Kombinationspräparat bereits in der Langzeittherapie eingesetzt wird.

Zur Langzeitmedikation werden je nach Therapiestufe inhalative Corticosteroide (ICS), inhalative langwirksame β 2-Sympathomimetika (LABA), langwirksame Anticholinergika (LAMA) und ggf. Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LTRA) in unterschiedlichen Kombinationen und Dosierungen eingesetzt.

Als „Add on Therapie“ in Stufe 5 kommen orale Corticosteroide und unter bestimmten Bedingungen Biologicals wie zum Beispiel Anti-IgE-Antikörper (Omalizumab) zum Einsatz (Buhl et al. 2017; Bundesärztekammer (BÄK) 2020).

**Medikamentöse Langzeittherapie des Asthma bronchiale – Stufenschema
(NVL Asthma 2020)(Bundesärztekammer (BÄK) 2020)**

	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5
Dauertherapie (1. Wahl)	Keine	ICS (niedrige Dosierung) <u>alternativ:</u> Keine	ICS + LABA (Fixkombination in niedriger Dosierung)	ICS + LABA (Fixkombination in mittlerer / hoher Dosierung)	ICS + LABA (Fixkombination in hoher Dosierung) + LAMA <u>Add-on-Therapie:</u> Anti-IL-5- /Anti- IL-4-R- / Anti- IgE- Antikörper
Alternativen	ICS (niedrige Dosierung)	LTRA (v.a. Kindesalter)	ICS (mittlere Dosierung) <u>Ausnahmefälle:</u> - ICS + LAMA als Fixkombination (niedrige Dosierung) - ICS (niedrige Dosierung) + LTRA	ICS + LABA (Fixkombination in mittlere / hoher Dosierung) + LAMA <u>Ausnahmefälle:</u> ICS + LABA als Fixkombination (mittlere / hohe Dosierung) + LTRA -ICS (mittlere bis hohe Dosierung) +LAMA	Orale Corticoide (zusätzlich oder alternativ) Azithromycin (zusätzlich)
Bedarfstherapie	ICS + Formoterol (Fixkombination/Off-Label-Use) <u>alternativ:</u> SABA		ICS + Formoterol (Fixkombination) <u>alternativ:</u> SABA		
Wirkstoffe	ICS: Budesonid, Fluticason LABA: Formoterol, Salmeterol LAMA: Tiotropiumbromid LTRA: Montelukast SABA: Salbutamol, Fenoterol, Terbutalin Anti-IL-5- /Anti-IL-4-R- / Anti-IgE- Antikörper: Mepolizumab/Dupilumab/Omalizumab				

Abbildung 2: Medikamentöses Stufenschema zur Langzeittherapie von Asthma für Erwachsene: Modifiziert nach der Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma, in Langfassung, 4. Auflage. Version 1. 2020. Abgerufen am 01.02.2022 www.asthma.versorgungsleitlinien.de. (Bundesärztekammer (BÄK) 2020)

1.8 Grade der Asthmakontrolle

Der Grad der Asthmakontrolle gilt als Orientierungshilfe sowohl bei der Auswahl der Stufe bei Initialtherapie als auch zur Eskalation/Deeskalation der Therapie bei Bedarf (siehe Tabelle 2)((GINA)).

Tabelle 2: Grad der Asthmakontrolle - Vereinfachtes Schema zur Messung der Asthmakontrolle gemäß GINA ((GINA))

Asthmatische Beschwerden in den letzten vier Wochen (1 Punkt pro Kriterium)	kontrolliertes Asthma	teilweise-kontrolliertes Asthma	unkontrolliertes Asthma
<ul style="list-style-type: none"> Asthmasymptome tagsüber >2x/Woche 	0 Punkte	1-2 Punkte	3-4 Punkte
<ul style="list-style-type: none"> nächtliches Erwachen aufgrund von Asthmasymptomatik 			
<ul style="list-style-type: none"> Bedarfsmedikation nötig >2x/Woche 			
<ul style="list-style-type: none"> Aktivitätseinschränkung durch Asthma 			

Quelle: Modifiziert und ins Deutsche übersetzt nach (GINA), G. I. f. A. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2020 update). Global Initiative for Asthma (GINA). Stand: 2020. Abgerufen am: 07.12.2020. <https://ginasthma.org/gina-reports/>.

1.9 Allergenspezifische Immuntherapie

Im Jahr 1911 wurde zum ersten Mal das Konzept der subkutanen Allergenextraktinjektion zum Ziel der Desensibilisierung von L. Noon in einer Versuchsreihe erprobt (Noon 1911). Bis heute ist die allergenspezifische Immuntherapie (AIT) die einzige krankheitsmodifizierende Therapiemöglichkeit von Allergien. Durch die AIT kann der Verlauf von Allergien moduliert und die Entstehung von allergischem Asthma verhindert werden. (Jacobsen et al. 2007; James et al. 2011; Brehler et al. 2013)

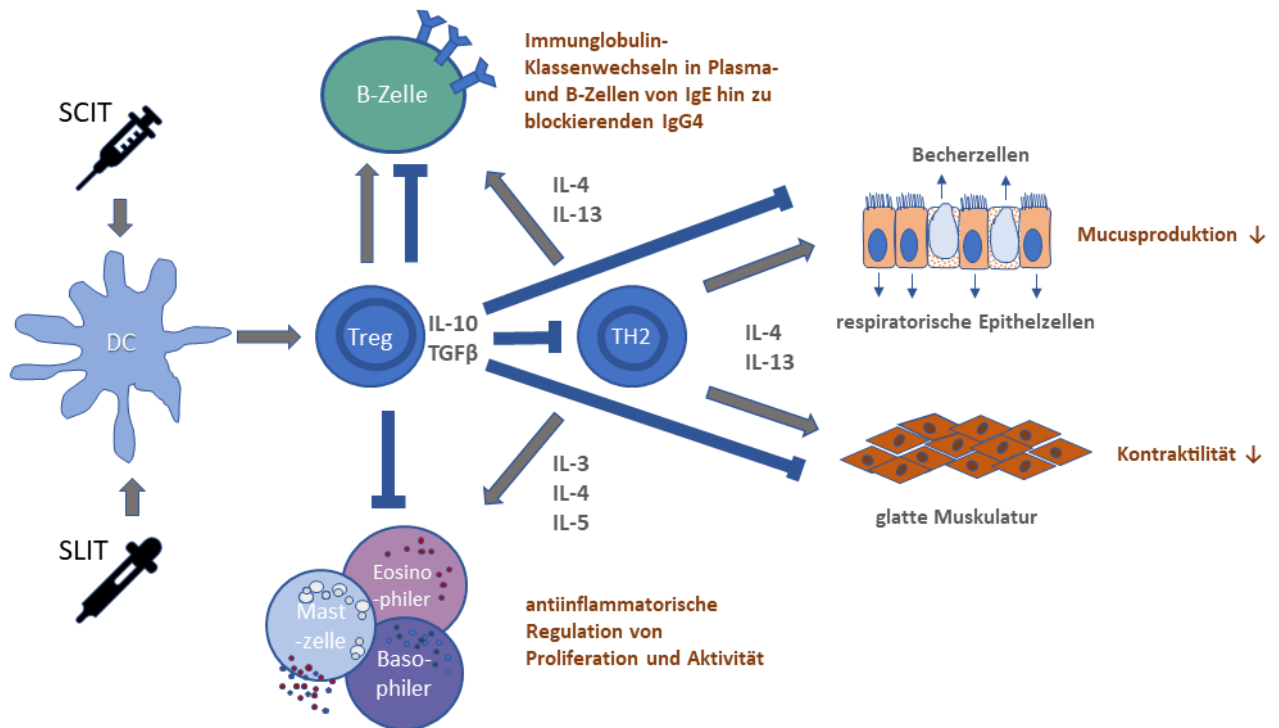


Abbildung 3: Mechanismen der allergenspezifischen Immuntherapie – Modifiziert und ins Deutsche übersetzt nach Fujita H., Soyaka M. et al (2012), Mechanisms of allergen-specific Immunotherapy (Fujita et al. 2012a), Licensed under CC BY 2.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395833/#> on 25.01.2022 (Fujita et al. 2012b)

Es handelt sich um ein therapeutisches Verfahren, bei dem eine standardisierte Allergenextraktdosis dem Patienten in definierten Abständen subkutan injiziert (SCIT) oder sublingual appliziert (SLIT) wird. Durch den wiederholten Kontakt des Immunsystems mit dem Allergen in steigender Dosierung kommt es zu einer Induktion von Immuntoleranz gegenüber dem Allergen. Dieser Mechanismus wird in Abbildung 3, modifiziert nach Fujita, Soyoka et al., dargestellt und beruht unter anderem auf der Induktion von allergenspezifischen regulatorischen T-Zellen, welche antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 und TGFβ sezernieren. Diese induzierte T-Zelltoleranz bewirkt eine antiallergische Veränderung auf mehreren Ebenen: Zum einen wird die TH2-Antwort vermindert und Mastzellen, dendritische Zellen, eosinophile sowie basophile Granulozyten werden in ihrer Proliferation und Aktivität antiinflammatorisch reguliert. (Fujita et al. 2012a; Murphy and Weaver 2018j; S2k-Leitlinie-DGAKI 2014)

Zum anderen kommt es zu Immunglobulin-Klassenwechsell in Plasma- und B-Zellen von IgE hin zu blockierenden IgG4. Die Induktion von IgG4 spielt eine wichtige Rolle in der Hemmung von IgE-facilitated antigen presentation (IgE-FAP) und führt konsekutiv zur verminderten TH2 Aktivierung (van Neerven et al. 1999). Zusätzlich

kommt es durch die blockierenden Antikörper zu einer verminderten Bindung von Allergenen an zellgebundenes IgE und somit zu einer verringerten Histaminausschüttung aus Mastzellen (Garcia et al. 1993; Visco et al. 1996). (Wurtzen et al. 2008)

Metaanalysen belegen eindeutig die Wirksamkeit von SCIT und SLIT für bestimmte Allergene und Altersgruppen. Allerdings liegen je nach Allergen und Altersgruppe unterschiedliche Wirksamkeitsprofile vor (S2k-Leitlinie-DGAKI 2014). Für die saisonale allergische Rhinitis ist die Wirksamkeit der allergenspezifischen Immuntherapie durch viele Studien belegt und sollte auch wegen des sekundärpräventiven Effekts, der Reduktion des Asthmarisikos, möglichst früh zur Anwendung kommen. Bei bereits bestehendem allergischem Asthma ist die Immuntherapie ebenfalls empfohlen, wenn ein klarer Zusammenhang zwischen dem Allergen und den Asthmabeschwerden besteht. Sie ist jedoch kein Ersatz für die antiasthmatische Stufentherapie und sollte nur bei kontrolliertem Asthma erfolgen. (Buhl et al. 2017; S2k-Leitlinie-DGAKI 2014; Calderon et al. 2020)

Eine systematische Metaanalyse von Dhimi et al. zeigt zudem, dass eine durchgeführte AIT den Medikamentenverbrauch in Verbindung mit AR und AA signifikant reduziert (Dhimi et al. 2017).

1.10 Blut und Sputum als Untersuchungsmatrices zur Detektion pathophysiologischer Prozesse

Zur Detektion von Veränderungen auf immunologischer und zellulärer Ebene im Rahmen von allergischen Atemwegserkrankungen bieten sich als Matrices Blut und Sputum an. Beide sind mit geringem Aufwand zu gewinnen und lassen zwei unterschiedliche Blickwinkel auf die Erkrankung zu. So kann die Auswirkung allergischer Atemwegserkrankungen auf den Organismus - systemisch und auf das Kompartiment der unteren Atemwege - untersucht werden.

Im Blut kann die systemische Beteiligung an der allergischen Entzündung durch die Messung spezifischer IgE Levels und die Zellverteilung der Subpopulationen beurteilt werden. Für letztere Untersuchung eignet sich die Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Diese beinhalten Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), NK-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen. Durch ein spezielles

Separationsverfahren werden rote Blutkörperchen und Granulozyten von dieser Fraktion abgetrennt und die PBMCs können separat weiter charakterisiert werden (Kleiveland 2015).

Sputum als Matrix hingegen ermöglicht eine unmittelbare Momentaufnahme des lokalen Entzündungsgeschehens in der Lunge, welches der systemischen Entzündungssituation im Blut gegenübergestellt werden kann.

Bei Sputum handelt es sich um das abgehustete Sekret aus den Atemwegen. Es beinhaltet die in die pathophysiologischen Prozesse involvierten immunologischen Zellen, aber auch viel Mucus sowie die in ihm gebundenen Schmutzpartikel und abgeschilferte Zellen. Die Isolation des Zellanteils aus dem restlichen Sputum ist unerlässlich, um diese Zellen weiter charakterisieren zu können.

1.10.1 γ/δ T-Zellen

γ/δ T-Zellen machen 1-10% des peripheren T-Zellpools aus. Sie haben die Eigenschaft, sich lokal in Schleimhäuten oder Epithelien anzureichern, wo sie 50% und mehr der T-Zellpopulation ausmachen können (Kabelitz, Wesch, and Hinz 1999; Zheng and Yang 2014). γ/δ T-Zellen exprimieren eine Vielzahl von Integrinen, welche die Anreicherung in definierten Kompartimenten des menschlichen Organismus begünstigen und vermitteln (Siegers 2018).

Im Gegensatz zu den „gewöhnlichen“ T-Zellen besitzen γ/δ T-Zellen keinen α/β T-Zellrezeptor, sondern einen γ/δ konfigurierten T-Zellrezeptor. Das Spezielle an diesem γ/δ T-Zellrezeptor ist, dass er antikörperähnliche Eigenschaften besitzt (V-Domain und C-Domain). Durch diesen Rezeptor sind γ/δ T-Zellen in der Lage, Antigene ohne vorherige Prozessierung und MHC-Präsentation zu erkennen (Murphy and Weaver 2018b; Carding and Egan 2002; Allison et al. 2001). γ/δ T-Zellen aus allergischen Individuen sind in der Lage, Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) aus gewissen Pollen CD1d-abhängig zu erkennen und daraufhin zu proliferieren und sowohl TH-1 als auch TH2-Zytokine auszuschütten (Russano et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass γ/δ T-Zellen auch der Phagozytose und der konsekutiven Antigenpräsentation mittels MHC-II befähigt sind – eine Funktion, die zuvor nur myeloischen Zellen zugeschrieben wurde – und somit Teil des innate Immunsystems ist (Wu et al. 2009).

Durch ihre zusätzliche Fähigkeit, TH1-, TH2- und TH17-Zytokine zu produzieren, werden γ/δ T-Zellen auch als „Brücke“ zwischen innatem und adaptivem Immunsystem bezeichnet (Murphy and Weaver 2018c; Mangan et al. 2013; Holtmeier and Kabelitz 2005).

1.10.2 NKT-Zellen

NKT-Zellen sind eine spezialisierte Untergruppe der T-Zellen. Sie exprimieren einen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit limitierter Diversität der α -Kette, weshalb sie auch invariante NKT-Zellen genannt werden. Zusätzlich zu ihrem invarianten TCR können sie Oberflächenmoleküle der natürlichen Killerzelle exprimieren – zum Beispiel CD56, CD161 oder NKG2D (Kim, Johnston, and Butcher 2002; Kuylenstierna et al. 2011; Murphy and Weaver 2018a). Als erster, starker Aktivator der NKT-Zellen wurde 1997 der aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritius* gewonnene Stoff namens α -Galactosylceramid identifiziert (Kawano et al. 1997). NKT-Zellen machen zwischen 0,01% und 0,2% des peripheren T-Zellpools aus (Lee et al. 2002) und sind vor allem in immunologischen Prozessen in peripher lymphatischem Gewebe und in mucosalen Oberflächen involviert. (Murphy and Weaver 2018d)

Funktionell unterscheiden sich NKT-Zellen von MHC-limitierten T-Zellen. NKT-Zellen erkennen prozessierte Lipide, Lipoproteine und Glykolipide von Pathogenen und Allergenen, welche CD1d-abhängig präsentiert werden, über ihren invarianten TCR. CD1d ist ein MHC-I ähnliches Molekül und wird von antigenpräsentierenden Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. (Murphy and Weaver 2018c; Bendelac, Savage, and Teyton 2007; O'Reilly et al. 2011). Die meisten Allergene enthalten neben Proteinstrukturen auch Kohlehydrat- und Lipidanteile (Garcia - 2017). So können NKT-Zellen, wie auch γ/δ T-Zellen, mittels Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) aus Zedernpollen stimuliert werden (Agea et al. 2005).

Die Interaktion zwischen NKT-Zell TCR und CD1d-Antigen Komplex führt zur Aktivierung der NKT-Zellen (Rossjohn et al. 2012). Es kommt zu einer rapiden und massiven Zytokinausschüttung von TH1-, TH2-, TH17- sowie regulatorischen Zytokinen, wie z. B. INF γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 und TNF. Dadurch können NKT-Zellen – ohne Notwendigkeit einer klonalen Expansion ihrerseits – neben Effektorfunktionen sowohl stimulierende als auch supprimierende Effekte auf diverse Zellen des Immunsystems ausüben. (Coquet et al. 2008; O'Reilly et al. 2011; Rossjohn

et al. 2012) Zusätzlich tragen NKT-Zellen mit direkten wie indirekten zytotoxischen Effektorfunktionen zur antitumoralen sowie antimikrobiellen Immunität bei (Kuylentierna et al. 2011).

Somit erfüllen die NKT-Zellen über ihre NK-Zelleigenschaften Funktionen der innate Immunantwort, und über ihre T-Zelleigenschaften sowie Mediatorfreisetzung Funktionen der adaptiven Immunantwort. (Coquet et al. 2008; O'Reilly et al. 2011; Van Kaer, Parekh, and Wu 2011).

2 Fragestellung

2.1 γ/δ T-Zellen und NKT Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen- ubi stamus

γ/δ T-Zellen und NKT Zellen haben Schnittstellenfunktionen zwischen adaptiver und innater Immunantwort inne. Beide Zellarten allergischer Individuen können durch PE aus Pollen stimuliert werden (Agea et al. 2005; Russano et al. 2006). Zugleich impliziert die Anreicherung der beiden T-Zell-Subpopulationen in immunologischen Grenzflächen wie z. B. der Lunge ihre Beteiligung an der Immunopathologie allergischer Atemwegserkrankungen (Urboniene et al. 2013; Akbari et al. 2006; Thomas, Chyung, and Luster 2010). Hierbei fungiert Sputum als Momentaufnahme des immunologischen Geschehens der Lunge. Die Rolle von γ/δ T-Zellen und NKT Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen, ihre komplexen Funktionen implizierend, ist noch nicht abschließend geklärt und wird teils kontroversiell diskutiert.

2.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Beantwortung der noch offenen Fragen beizutragen. So erfolgte in dieser Studie die explorative Untersuchung von T-Zell-Subpopulationen in allergischen Atemwegserkrankungen, mit Fokus auf γ/δ T-Zellen und NKT-like Zellen. Das Hauptaugenmerk der Versuche galt der quantitativen und qualitativen Untersuchung der T-Zell-Subpopulationen in Sputum sowie im Blut. Ziel war die genaue Untersuchung der Zellverteilung, Zellsubpopulationen und des Effekts von Immuntherapie (AIT) auf eben diese. Mögliche Zusammenhänge zwischen den Zellpopulationen wurden ebenso untersucht wie Zusammenhänge klinisch erhobener Daten mit gemessenen allergisch-entzündlichen Parametern. Es folgte die Auswertung und die Interpretation der Ergebnisse im Kontext des aktuellen Wissensstandes.

Die folgende Aufzählung zeigt einen Überblick über die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

- 1.) Zusammenhänge klinisch erhobener Daten mit gemessenen allergisch-entzündlichen Parametern

- Der "Mini *Rhinococonjunctivitis Quality of Life Questionnaire*" als klinischer Parameter - Vergleich In/Off-Season; Korrelationen IgE-Level im Serum sowie Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Sputum

2.) Durchflusszytometrische Untersuchung von Sputum und PBMCs

- Analyse des Auswertungspanels und der Gatingstrategie auf Eignung für beide Untersuchungsmatrices

3.) Durchflusszytometrische Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen (CD3/CD5+ T-Zellen; CD25+ T-Zellen; γ/δ T-Zellen; CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen; NKT-like Zellen) während und außerhalb der Allergiesaison von Gräserpollen

- Welche Unterschiede bestehen zwischen den Matrices Sputum und PBMCs, – Sputum als Fenster zum Entzündungsgeschehen in der Lunge?
- Welche Unterschiede hinsichtlich der T-Zell-Subpopulationen bestehen zwischen den drei Gruppen der Kontrollen, der Allergiker ohne Immuntherapie und der Allergiker mit Immuntherapie?
- Welche Unterschiede hinsichtlich der T-Zell-Subpopulationen bestehen zwischen den Untergruppen: Probanden mit allergischer Rhinitis ohne Immuntherapie, Probanden mit allergischer Rhinitis mit Immuntherapie, Probanden mit allergischem Asthma ohne Immuntherapie und Probanden mit allergischem Asthma mit Immuntherapie?
- Welche Unterschiede zeigen sich in Bezug auf erfolgte / nicht erfolgte Immuntherapie (AIT)?
- Identifizierung von Subpopulationen der γ/δ T-Zellen; CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen und deren Verteilung – Gibt es Hinweise auf einen pro- bzw. antiallergischen Phänotyp?

4.) Korrelation durchflusszytometrischer Daten

- Diskussion der Hinweise auf eine Interaktion der Zellreihen (NKT-like Zellen und CD25+ Zellen)

3 Methoden und Materialien

3.1 Hilfsmittel

3.1.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Vernebler	Pari Turbo Boy SX	PARI, DE
Spirometer	Spiro Plus	Jaeger, USA
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0 R 380R 5 U30R	HeraeusInstruments Hettich Eppendorf
Zytospin Zentrifuge	Cytospin 4	Thermo Scientific, USA
Zytospinhalter	Shandon Cytoclip	Thermo Scientific, USA
Zytofunnels	TPX, Sample Chamber, Shandon	Thermo Scientific, USA
Kühlschrank	+4°C	Siemens
Gefrierschrank	-80°C	Heraeus Instruments, DE
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Schüttler	Roller Mixer SRT9D	Stuart
Mikroskope	Axiovert 40C Mikroskop	Zeiss, DE Leica
Zählkammer	Neubauer Improved	Marienfeld GmbH
Waage	Kern 572, (0,01g)	Kern und Sohn GmbH, DE
Pipetten	Eppendorf research 100-1000µl 10-100µl 0,5-10µl 0,1-2,5µl Transferpipette 20-200µl	Eppendorf, DE Brand
Eismaschine	Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, DE
Durchflusszytometrie- gerät	FACS LSR II Fortessa	BD Bioscience
Blutdruckmessgerät		Boso medicus
Computer	Swift3	Acer

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Materialien

Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Adapter	REF	SARSTEDT
Butterflykanülen	Safety-Multifly-Kanüle	SARSTEDT
Hautantiseptikum	Octeniderm	Schülke
Bronchodilatator	Sultanol 100 mg / Dosis	GlaxoSmithKline
Schwangerschaftstest	hcg combo	HITADO
Falcon Röhrchen	CellStar (15 ml, 50 ml)	Greiner BioOne, DE
Blutentnahmeröhrchen	Vacutainer CPT™	BD Bioscience
Serumröhrchen	Monovette	SARSTEDT
Petrischalen	Petrischalen, 7 cm	Greiner BioOne, DE
Impföse	Soft Loop 10 µl	Copan Italia S.P.A., ITA
Pricktestlösung	Physiologische Kochsalzlösung Histamin 1+999 309 Katzenepithelien 006 Gräser 108 Birke 708 Dermatophagoides farinae 725 Dermatophagoides Pteronyssimus	Allergopharma
Pricktestlanzette		Allergopharma
Zellsiebe	70 µm Nylon, BD Falcon Cell Strainer	BD Falcon, USA
Deckgläser	20x26 mm	Menzel Gläser GmbH, DE
Reaktionsgefäß	1.5 ml Eppendorf tubes 2,0 ml Eppendorf tubes	Eppendorf, DE
Pipetten Spitzen	Kunststoff ep T.I.P.S. 1000 µl 200 µl 100 µl 10 µl	Eppendorf, DE
Pipetten Spitzen	Glas Cellstar® 25 ml 10 ml 5 ml 2,5 ml	Greiner BioOne, DE

Objektträger	Mattschliff oder Superfrost	Thermo Scientific, Menzel Gmbh, DE
Deckglas für Objektträger	Cover Slips 24x60 mm	Menzel Gmbh, DE
Filter Cards	Shandon Filter Cards	Thermo Scientific, USA
96- roundwell suspension cell plate	TC-Platte 96 well Suspension	SARSTEDT, DE
Färbewanne		
Papierfilter	Faltenfilter 595 ½, Ø185 mm	Schleicher und Schnell, DE
Meßzylinder	100 ml, 200 ml	
Einmalpipette	Pasteurplastik Pipette 3 ml	NeoLab, DE
Facs Röhren	Röhrentubes 5 ml	Sarstedt, DE

3.1.3 Programme

Tabelle 5: Programme

Programme	Version	Hersteller
EndNote	X8	Clarivate Analytics
Excel		Microsoft Corporation, USA
FACS Diva Software	7.0	Becton Dickensen, USA
GraphPadPrism	6.01	Graphpad Software, USA
Visual basic excel	1.0	programmiert von Jose Oteros
Windows	10	Microsoft Corporation, USA

3.1.4 Reagenzien

Tabelle 6: Reagenzien

Produkt	Bezeichnung/ Zusammensetzung	Hersteller
Methanol	Methanol, Emsure	Merck KGaA, DE
Immersionsöl	Type N Immersion liquid	Leica Microsystems CMS GmbH, DE

DPBS	DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco® Life technologies
Aqua destillata	Ampuwa 100 ml H2O	Fresenius Krabi
Tryptanblau	Tryptan Blue Stain 0,4% (1:10 mit DPBS)	gibco® Life technologies
NaCl	3%, 4%, 5%	Apotheke MRI
NaN3	NaN3 2% in DPBS	
FACSClean	1% Hypochloridsäure, Natriumsalz (1:1); 0,8% Natriumhydroxid	BD Bioscience
FACSRinse	Na(N3)	BD Bioscience
FCS	Fetal calf serum	HyClone
Aceton	LiChrosolv®	Merck KGaA, DE
May-Grünwald-Lösung	May-Grünwald's eosine methylene blue solution, modified	Merck KGaA, DE
Giemsa Lösung	Giemsa's azur eosin methylene blue solution	Merck KGaA, DE
RNAprotect Cell Reagent		Qiagen
Eukitt	Eukitt, Fluka Analytical	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE
Xylol		Merck
Antikörper	Siehe Antikörper Tabelle	
7 AAD	BD Pharmingen™ 7-AAD	BD Bioscience
Beads	Anti-Mouse Ig k BD Comp Beads Cytometer Setup&Tracking Beads	BD Bioscience
Sputolysin	Sputulysin Reagent DTT:H2O (1:10)	EMD Millipore Corp., USA
FACS Puffer	475 ml DPBS, 25 ml FCS, 100 µl NaN3	

3.1.5 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Target	Fluorochrom	Clone/ Firma/ Lot: Nr.
CD3	V500 (AmCyan) mouse anti-human	Clone: UCHT1/ BDBiosciences/ Lot:2326874
CD5	FITC (AP 488) anti-human	Clone: UCHT2/ BioLegend/ Lot:195378
CD19	BV 605 (Qdot605) anti-human	Clone: HIB19/ BioLegend/ Lot: B196360
CD25	BV650 anti-human	Clone: BC96/ BioLegend/ Lot: B198900
CD27	BV711 anti human	Clone: O323/ BioLegend/ Lot: B199626
CD45	APC Cy7 anti-human	Clone: HI30/ BioLegend/ Lot: B202687
CD56	AF700 anti-human	Clone: HCD56/ BioLegend/ Lot: B172649
γ/δ TCR	PE-Cy7 anti-human	Clone: B1/ BioLegend/ Lot: B195333
Human TrueStain FcX™	-	BioLegend
7AAD	PerCP	BD Biosciences/ Lot: 4227991

3.2 Studienteilnehmer

3.2.1 Ethische Richtlinien

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Studie wurden durch die Ethikkommission der Technischen Universität genehmigt. Studienteilnehmer wurden vor Einschluss in die Studie vollumfänglich aufgeklärt. Von jedem Teilnehmer wurde zudem eine schriftliche Einwilligung eingeholt (Ethik Votum Pacific: 5534/12).

Bei der Verarbeitung der Blut- und Sputumproben wurden die ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen eingehalten, welche in der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki festgelegt sind (WMA 2013).

3.2.2 Charakterisierung des Studienzeitraums und der Probanden

Die Probanden wurden in der Pollenflugsaison (In-Season) und außerhalb der Pollenflugsaison (Off-Season) untersucht. Es wurden pro Proband jeweils zwei Proben zu zwei Zeitpunkten gewonnen. Als Grundlage zur Bestimmung der Pollenflugsaison diente der „regionale Pollenkalender süddeutscher Raum“, mit Hilfe dessen sie von Mitte Mai bis Mitte Juli festgelegt wurde (Werchan, Werchan, and Bergmann 2018).

Regionaler Pollenflugkalender Süddeutscher Raum

(nach Pollenflugdaten von 2011 bis 2016)



© Stiftung Deutscher
Polleninformationsdienst
Charitéplatz 1, 10117 Berlin

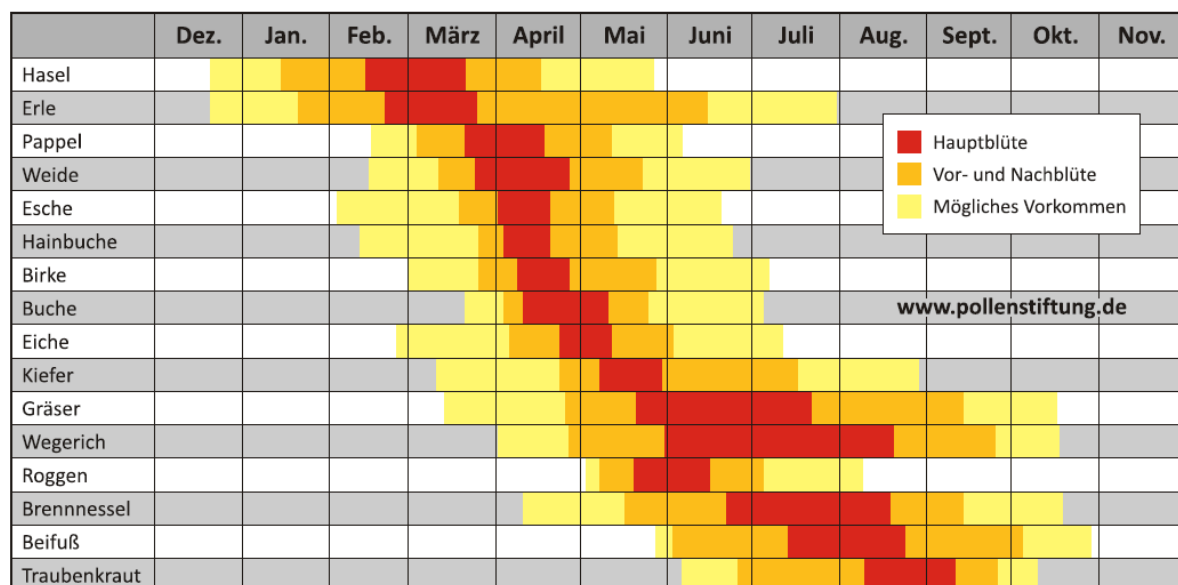


Abbildung 4: Regionaler Pollenflugkalender süddeutscher Raum - Quelle: Werchan, M., Werchan, B. & Bergmann, KC. (2018), Deutscher Pollenflugkalender 4.0: Update der regionalen Pollenflugkalender 4.0 mit Messdaten von 2011 bis 2016. *Allergo J 28*, 16–17 (2018). <https://doi.org/10.1007/s15007-019-1887-9>, mit freundlicher Genehmigung von M. Werchan. (Werchan, Werchan, and Bergmann 2018)

Der sogenannte Off-Season-Zeitraum definiert sich dadurch, dass in diesem Zeitraum kein Gräserpollenflug gemessen werden kann. Da dies für den Zeitraum von November bis Mitte Februar zutrifft, definierten wir diese Periode als Off-Season. Durch diese Zeitraumfestlegung konnte auch eine Verfälschung der Ergebnisse durch Frühblüher (Erle, Hasel) bei Probanden, welche eine zusätzliche Sensibilisierung für Frühblüher aufwiesen, minimiert werden (siehe Abbildung 4).

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte zum Teil aus dem Probandenpool der PACIFIC-Studie (Langzeitstudie für Biomarker der AIT) und wurde durch Freiwillige im universitären und privaten Umfeld ergänzt.

An der Studie nahmen In-Season 57 Probanden teil, darunter 21 Kontrollen und 36 Allergiker. Die Gruppe der Allergiker unterteilte sich weiter in 23 Probanden mit allergischer Rhinitis und 13 Probanden mit allergischem Asthma. Die Diagnosen allergische Rhinitis und allergisches Asthma waren zeitlich und kausal unabhängig von unserer Studie bereits ärztlich diagnostiziert worden im Sinne einer „doctor diagnosed allergic rhinitis / asthma“. In der Gruppe der Allergiker hatten 18 Probanden eine allergenspezifische Immuntherapie gegen Gräserpollen abgeschlossen.

Off-Season wurden dieselben Probanden eingeladen, wobei allerdings nur 55 Probanden dieser Einladung nachkamen. Gründe für das Nichterscheinen zweier Probanden waren ein Auslandsaufenthalt und mangelnde Compliance. Die Probandenverteilung wird in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 8: Gruppeneinteilung

	Kontrollen	AR-AIT	AR+AIT	AA-AIT	AA+AIT
In-Season	21	12	11	6	7
Off-Season	21	11	10	6	7

- AR-AIT: Probanden mit allergischer Rhinitis ohne Immuntherapie
- AR+AIT: Probanden mit allergischer Rhinitis mit Immuntherapie
- AA-AIT: Probanden mit allergischem Asthma ohne Immuntherapie
- AA+AIT: Probanden mit allergischem Asthma mit Immuntherapie

Als Einschlusskriterium galt die Volljährigkeit der Probanden. Kontrollprobanden durften keine Allergien aufweisen. Ausschlusskriterien stellten eine bestehende Schwangerschaft, ein FEV1 <70% (Spirometrie) / unkontrolliertes Asthma (GINA-Klassifikation), eine dauerhafte Medikamenteneinnahme, ein akuter Infekt oder Raucherstatus dar.

Die Einnahme von Antihistaminika wurde mindestens sieben Tage vor der Untersuchung abgesetzt, um die Aussagekraft der Allergiediagnostik nicht zu beeinträchtigen. Auf eine Pausierung der antiasthmatischen Therapie wurde im Rahmen der Studienteilnahme aufgrund der möglichen Gefahr von Asthmaanfällen verzichtet.

Zur objektivierbaren Charakterisierung von Allergikern und Kontrollen wurde bei allen Probanden ein Pricktest durchgeführt. Bei Allergikern bestand idealerweise anamnestisch eine isolierte Gräserpollenallergie. Ganzjährige Allergien, wie zum Beispiel Tierepithelien- oder Hausstaubmilbenallergie, stellten kein Ausschlusskriterium dar, sofern kein dauerhafter Kontakt zum Allergen bestand. Es wurde das Gesamt-IgE der Probanden bestimmt. Zur weiteren Objektivierung wurde im Serum der Probanden das spezifische IgE per RAST-Test (Radio-Allergo-Sorbent-Test) gemessen. Bei einer starken Divergenz zwischen Prick- und RAST-Test Ergebnis wurde zusätzlich spezifisches IgE im Serum mittels Immunocap-Tests bestimmt.

Zur Objektivierung der Beeinträchtigung durch die allergische Atemwegserkrankung wurden die Probanden gebeten, den MiniRQLQ („*Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire*“) auszufüllen. Dieser Fragebogen besteht aus 14 Fragen zu fünf verschiedenen Bereichen und dient der Quantifizierung der Lebensqualitätseinschränkung durch die Erkrankung (z. B. Aktivitätseinschränkung oder okulonasale Symptome). Der MiniRQLQ vergibt von 0 bis 6 Punkte, wobei 0 für keine Beschwerden und 6 für eine schwere Beeinträchtigung der Lebensqualität stehen (Juniper et al. 2000).

Klinische Daten zu den Probanden sind in Tabelle 11 zusammengefasst (siehe 5.2).

3.2.3 Klinische Probengewinnung

Die Probengewinnung und Verarbeitung von Sputum und Blut erfolgte nach einem validierten Protokoll von Dr. Zissler (Zissler 2012).

Vor der Gewinnung von Blut- und Sputumproben wurden bei allen Probanden Blutdruck und Puls bestimmt. Bei jedem Probanden wurde auch ein Pricktest auf gesunder Haut an der Unterarminnenseite durchgeführt.

Die Induktion diente der nicht invasiven Probengewinnung von Sputum, um daran die Fertigung von Zytospins zur Zytodifferenzierung und die durchflusszytometrische Untersuchung anzuschließen.

Die Blutentnahme von peripher venösem Blut diente der Gewinnung von PBMCs und Serum. Die PBMCs wurden ebenfalls mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Aus dem Serum wurden die IgE-Level der Probanden bestimmt.

3.3 Sputuminduktion

Zur Probengewinnung wurden 3%, 4% und 5% NaCl Lösung aus der Klinikapotheke zur Inhalation verwendet.

Tabelle 9: Inhalationslösungen

Inhalationslösung Nr.	NaCl Konzentration	Zusammensetzung
1	3%	19 ml Aqua dest. + 20 ml 5,85% NaCl
2	4%	13 ml Aqua dest. + 28 ml 5,85% NaCl
3	5%	6 ml Aqua dest. + 35 ml 5,85% NaCl

Vor Beginn der Induktion wurden Probandinnen gebeten, einen Schwangerschaftstest mittels β -HCG Bestimmung im Urin durchzuführen, um eine bestehende Schwangerschaft auszuschließen. Eine bestehende Schwangerschaft hätte ein Ausschlusskriterium dargestellt.

Bei allen Probanden wurde zu Beginn dreimal der FEV1-Wert mittels Spirometer nach ERS-Guidelines (Miller et al. 2005) bestimmt. Der höchste der drei Werte wurde als Baseline FEV1- Wert vor der Bronchodilatation und Induktion festgelegt.

Anschließend inhalierten die Probanden 400 μ g Salbutamol. 15 Minuten nach Bronchodilatation wurde erneut dreimal der FEV1-Wert ermittelt. Bei einem FEV1 Wert von <70% nach Bronchodilatation wurde keine Induktion durchgeführt. Der beste Post-Bronchodilatations-FEV1 bildete die Grundlage für die Berechnung des FEV1-Abfalls nach der Induktion. Der FEV1-Abfall wurde nach jedem der drei siebenminütigen Induktionszyklen (3% NaCl, 4% NaCl, 5% NaCl) erneut berechnet.

Aus Gründen der Probandensicherheit wurde bei einem Post-Induktions-FEV1 Abfall um >10% und < 20% (nach Verifizierung durch dreimalige Messung) den Probanden

200 µg Salbutamol verabreicht und die Sputuminduktion nicht mit der nächsthöheren NaCl Konzentration, sondern der bereits gehalten fortgesetzt. Für den Notfall eines Abfalls des FEV1 nach einer der drei Induktionszyklen > 20% wäre vorgesehen gewesen, 200 µg Salbutamol zu verabreichen und die Induktion abubrechen. Auch bei Erscheinen signifikanter Symptome während der Inhalation von NaCl wäre der Versuch sofort gestoppt und 200 µg Salbutamol verabreicht worden.

Für jeden Induktionszyklus wurden die Probanden gebeten mit aufgesetzter Nasenklammer die drei verschieden konzentrierten NaCl-Inhalationslösungen (3% NaCl, 4% NaCl, 5% NaCl) über den Ultraschallvernebler sieben Minuten lang zu inhalieren. Nach je sieben Minuten wurde der Proband gebeten, sich den Mund gründlich zu spülen und sich die Nase zu reinigen, da so der Anteil an squamösen Zellen im Sputum reduziert werden kann. Nach diesem Vorgang wurden die Probanden gebeten, Sputum in einen vorgewogenen 50 ml Falcon abzuhusten.

Dieses Protokoll wurde, wenn möglich, für alle drei NaCl-Konzentrationen wiederholt. Insgesamt wurde dreimal Sputum abgehustet und dieses auf Eis (0-4°C) gelagert.

3.4 Blutentnahme

Für die PBMCs Gewinnung wurde jedem Probanden bei gestautem Arm mittels Butterfly-Kanüle Blut in Vacutainer CPT™-Tubes abgenommen. Die Röhren wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert.

3.5 Aufbereitung des Sputums

Das gesammelte Sputum wurde auf Eis (0-4°C) gelagert. Das Gesamtgewicht des Sputums wurde ermittelt und in das Protokollblatt eingetragen.

Danach wurde das Sputum in eine sterile Petrischale überführt und die Plaques mittels Pinzette oder Impföse und Eppendorf Pipette (1000 µl) selektiert. Wenn nötig, wurde das Sputum mit Hilfe eines inversen Mikroskops voruntersucht, um die Plaques, die sich unter dem Mikroskop zellreich darstellen, besser differenzieren zu können. Das selektierte Sputum wurde anschließend in einen vorgewogenen 50 ml Falcon überführt, auf Eis gelagert und anschließend gewogen, um das Gesamtgewicht des selektierten Sputums zu ermitteln.

Daraufhin wurde die berechnete Menge Sputolysin hinzugefügt (4 x Gewicht [g] des selektierten Sputums). Die Sputumplugs wurden durch Aspirieren mit der Pipette gelöst, anschließend 15 Sekunden gevortext und danach für 15 Minuten auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert.

Danach wurde die berechnete Menge an DPBS hinzugegeben (2 x Gewicht [g] des selektierten Sputums) und die Probe nochmals für 15 Sekunden gevortext. Die Probe wurde anschließend über einen mit DPBS angefeuchteten 70 µm Filter in ein vorgewogenes 50 ml Falcon überführt und das gefüllte Röhrchen gewogen, um das Gesamtgewicht der Probe zu ermitteln. Der Wert wurde im Arbeitsblatt dokumentiert.

Die Gesamtzellzahl und die Vitalität der Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit der Trypan-Blau-Methode bestimmt. Dafür wurden 10 µl Probe mit 10 µl Trypanblau (Verdünnung 1:10 mit H₂O) in einem 1,5 ml Eppendorf Tube vermischt und anschließend in die Neubauer-Zählkammer eingeführt. Die Zellzählung erfolgte in allen vier Quadranten und wurde innerhalb von fünf Minuten durchgeführt, da eine längere Einwirkdauer des Farbstoffs zytotoxisch ist. Gezählt wurden lebende Leukozyten, tote Leukozyten und squamöse Zellen. Daraufhin wurde der Durchschnittswert pro Quadrant bestimmt und der prozentuale Anteil der einzelnen Gruppen errechnet.

Die aufbereiteten Sputumproben wurden bei 4°C mit 2000 rpm über zehn Minuten lang bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und in vier gleiche Aliquots übertragen, wenn möglich 1000 µl, mindestens aber 200 µl pro Aliquot. Zusätzlich wurde ein fünftes Aliquot mit jeweils 500 µl Überstand und 500 µl Methanol hergestellt. Es erfolgte eine umgehende Lagerung bei -80°C. Die Überstände wurde zur möglichen weiteren Untersuchung des Sputums auf Zytokine eingefroren.

Das Zellpellet wurde mit DPBS auf $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt (gesamte Leukozyten (10^6) / $0,5 \times 10^6 =$ Auffüllvolumen in ml).

Daraus wurden je vier Zytospin-Präparate hergestellt (siehe 3.7 Zytospins (Sputum)).

Für die FACS Färbung wurden je 1×10^6 Zellen für die stained Probe und für die unstained Probe auf ein 96-roundwell suspension cell plate (nicht absorbierend) übertragen und weiter verfahren (siehe 4.8.2. Färbung).

Die überbleibende Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml RNAprotect Cell Reagent aufgelöst und bei -80°C eingefroren

3.6 Aufbereitung des Blutes

Die in Vacutainer CPT™-Tubes abgenommenen Blutproben wurden nach der Entnahme für 20 Minuten bei 3000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (siehe Blutentnahme). Die Überstände der CPT™-Tubes wurden durch mehrmaliges Drehen um 180° zwischen Daumen und Mittelfinger gemischt und in ein 50 ml Falcon durch Eingießen überführt.

Die Überstände wurden bei Raumtemperatur und 1200 rpm für zehn Minuten zentrifugiert und aus dem Serumüberstand, ohne das Pellet zu berühren, fünf Proben entnommen. Es wurden viermal 1000 µl Serum in 1,5 ml Eppendorf Gefäße und in ein fünftes Gefäß 500 µl Serum pipettiert. In das fünfte Eppendorf-Gefäß wurden 500 µl Methanol hinzugefügt, und die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Das restliche Serum wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml sterilem DPBS aufgelöst. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl in einer Neubauer-Zählkammer mit der Tryptan-Blau-Methode bestimmt. Dafür wurden 10 µl Probe mit 10 µl Tryptanblau in einem 1,5 ml Eppendorf Tube vermischt und anschließend in die Neubauer-Zählkammer eingeführt. Die Zellzählung erfolgte in allen vier Quadranten und wurde innerhalb von fünf Minuten durchgeführt. Daraufhin wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt ($\text{Zellzahl} / \text{ml} = \text{Durchschnitt gezählte Zellen} \times 10.000 \times 2$; $\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl} / \text{ml} \times 10$).

Für die FACS Färbung wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen für die stained Probe und für die unstained Probe auf ein 96-roundwell suspension cell plate (nicht absorbierend) übertragen und weiter verfahren (siehe 3.7.2 Färbung).

Die eingestellte Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reagenzgefäß überführt und bei 2000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 1000 µl RNAprotect Cell Reagent aufgelöst und bei -80°C eingefroren.

3.7 Zytospins (Sputum)

Zytospins sind Objektträger, auf die in einem speziellen Verfahren Zellen appliziert werden, sodass sie anschließend gefärbt und unter Mikroskop ausgezählt werden können (Zytodifferenzierung).

3.7.1 Herstellung

Pro Proband wurden je vier Zytospin-Präparate hergestellt. Auf Slide 1 und 3 wurden jeweils 75 µl und auf Slide 2 und 4 jeweils 100 µl, der auf $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellten Zellsuspension appliziert (siehe 3.5 Aufbereitung des Sputums). Die Zytospins wurden für sechs Minuten bei 450 rpm zentrifugiert, die Objektträger 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und für fünf Minuten in Methanol fixiert.

3.7.2 Färbung

Die durch Methanol fixierten Zytospins wurden nach Pappenheim gefärbt. Dafür wurde zuerst die May-Grünwald Lösung über einen Papierfilter gefiltert. Anschließend wurden die Objektträger für acht Minuten in der Farbwanne mit der May-Grünwald Lösung gefärbt. Die Objektträger wurden danach mit Leitungswasser sorgfältig gespült, um Farbreste zu entfernen. Dies ist für eine spätere qualitative mikroskopische Auszählung essenziell. Die Giemsa-Lösung wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt (1:5; 20 ml Giemsa:80 ml Aqua destillata) und ebenfalls filtriert. Anschließend wurden die Objektträger darin für 35 Minuten gefärbt. Es wurde erneut gespült und die Objektträger lichtgeschützt getrocknet. Die getrockneten Objektträger wurden für zehn Sekunden in Xylol fixiert und erneut getrocknet. Zur Bedeckung mit dem Deckgläschen wurde dieses mit einem Tropfen Eukitt blasenfrei fixiert. Eventuelle Eukitt Rückstände wurden mittels Aceton entfernt.

3.7.3 Auszählung und Zytodifferenzierung

Das Sichtfeld wurde in vier Quadranten unterteilt und unter 100-facher Vergrößerung jeder Quadrant mäanderförmig erschlossen. In allen vier Quadranten wurden 100 Zellen ausgezählt. Gezählt wurden Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Squamöse Zellen wurden nicht in die Zählung eingeschlossen. Das Sputumdifferentialzellbild wurde von zwei Personen,

unabhängig voneinander, ausgezählt. Der Mittelwert aus den zwei Zählungen wurde berechnet und für die folgende Auswertung herangezogen.

3.8 Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren zur Analyse von Zelleigenschaften einzelner Zellen. Bei der durchgeführten FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell scanning*) wurden Lymphozyten mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und anschließend auf die gefärbten Oberflächenmoleküle hin geprüft sowie nach ihrem Oberflächenprofil in Subpopulationen eingeteilt.

In der Durchflusszytometrie fließen die mittels fluoreszierender Antikörper gefärbten Zellen in einer Flüssigkeitssäule einzeln an der Messeinheit vorbei. Sie werden mittels Laser bestrahlt, woraufhin die fluoreszierenden Antikörper Licht in verschiedenen Spektren streuen. Die Intensität unterscheidet sich je nach Anzahl der gebundenen Antikörper. Die spezifischen Fluoreszenzspektren werden anschließend in dem zugehörigen Kanal gemessen. Hierfür werden die Emissionen durch Farbfilter auf Photosensoren gelenkt. Die optischen Signale werden in elektrische umgewandelt. Die so gewonnenen Daten können anschließend mit Softwareprogrammen ausgewertet werden. Für diese Arbeit wurde die Software FACS Diva verwendet.

Bei den gefärbten Oberflächenmolekülen handelte es sich um Markermoleküle, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Diese können nach dem „Cluster of Differentiation“ von CD1 bis CD300 eingeteilt werden. CD-Moleküle haben viele unterschiedliche Funktionen und dienen der Zellinteraktion, zum Beispiel in Form von Rezeptoren, Adhäsions- und/oder Erkennungsmolekülen.

3.8.1 FACS-Färbung der PBMCs (Blutzellen)

Für die FACS-Färbung wurden je 1×10^6 Zellen für die stained Probe und für die unstained Probe auf ein 96-roundwell suspension cell plate (nicht absorbierend) übertragen (siehe 3.6 Aufbereitung des Blutes). Bei 1200 rpm und 4°C wurden die Platten für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden anschließend mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, erneut für drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt (Waschen + Zentrifugieren). Anschließend wurde

das Zellpellet mit 100 µl FACS-Antikörper Mastermix resuspendiert und 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Der Mastermix bestand aus je 0,5 µl von CD3-, CD5-, CD19-, CD25-, CD27-, CD45-Antikörper und je 1 µl von CD56 und γ/δ TCR- Antikörper und wurde mit FACS-Puffer auf 100 µl aufgefüllt.

Die Zellen auf der Platte wurden bei 1200 rpm und 4°C für drei Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen noch zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen (Waschen + Zentrifugieren). Zum Einlesen in die FACS Fortessa wurden die Zellen mit 100 µl FACS Puffer resuspendiert. Direkt vor dem Einlesen wurden den stained Proben 5 µl einer 1:3- verdünnten 7-AAD-Lösung hinzugegeben.

3.8.2 FACS-Färbung von Sputumzellen

Für die FACS Färbung von Sputumzellen wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen für die stained Probe und für die unstained Probe auf ein 96-roundwell suspension cell plate (nicht absorbierend) übertragen (siehe 3.5 Aufbereitung des Sputums).

Bei 1200 rpm und 4°C wurden die Platten für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden anschließend mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, erneut für drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, die Fc-Rezeptoren blockiert und die Platte für 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Die Zellen auf der Platte wurden bei 1200 rpm und 4°C für drei Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 200 µl FACS Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abschütten des Überstands wurde das Zellpellet mit 50 µl FACS Antikörper Mastermix resuspendiert und 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Der Mastermix setzte sich aus je 0,5 µl von CD3-, CD5-, CD19-, CD25-, CD27-, CD45-Antikörper und je 1 µl von CD56 und γ/δ TCR- Antikörper zusammen und wurde auf 50 µl mit FACS Puffer aufgefüllt

Die Zellen auf der Platte wurden bei 1200 rpm und 4°C für drei Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen noch zweimal mit 200 µl FACS Puffer gewaschen (Waschen + Zentrifugieren). Zum Einlesen in die FACS Fortessa wurde das Zellellet mit 100 µl FACS Puffer resuspendiert. Direkt vor dem Einlesen wurden den stained Proben 5 µl einer 1:3- verdünnten 7-AAD-Lösung hinzugegeben.

3.8.3 Kompensation

Das von einem fluoreszierenden Antikörper emittierte Farbspektrum kann über seinen zugeteilten Farbkanal hinaus schwach in andere Farbkanäle streuen. So können sich Signale verschiedener Antikörper überlagern und in mehr als einem Kanal zugleich gemessen werden. Um diese Überlagerung herauszurechnen, wurde vor Beginn der In-Season und der Off-Season jeweils eine Kompensation festgelegt. Dies erfolgte mit dem Prinzip der „Single colours“: Zur Einstellung der Kompensation wurden die festgelegten Antikörper an Beads gebunden und die Überlagerungen der Farbspektren anteilmäßig abgezogen. Zusätzlich wurden noch „Fluorescence minus one“ (FMO) Kontrollen durchgeführt, wobei alle Antikörper bis auf einen gefärbt werden, um den Einfluss der anderen Antikörper auf das fehlende Spektrum zu überprüfen und entsprechend zu korrigieren. Diese Kontrolle dient zum Ausschluss von falsch-positiven Signalen in der Färbung.

3.8.4 Antikörperwahl

Es wurden acht Antikörper zur Charakterisierung verschiedener Subpopulationen ausgewählt. Das Panel beinhaltet Antikörper gegen Oberflächenmarker von T-Zellen, γ/δ T-Zellen und NKT-like Zellen. CD19 ist ein B-Zellmarker und wurde zur Diskriminierung von T-Zellen und B-Zellen mitgefärbt.

Tabelle 10: Oberflächenmarker und ihre Funktion, Quelle: (Immunologie 2018)

Oberflächenmarker	Vorkommen auf Zellen	Funktion
CD3	Thymozyten, T-Zellen	Assoziiert mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR), notwendig für Signalübertragung und Zelloberflächenexpression von TCR
CD5	Thymozyten, T-Zellen, eine Untergruppe der B-Zellen	Verstärkt TCR-Signale und Akt-Signale in T-Zellen, erforderlich für TH2 und TH17 Differenzierung
CD19	B-Zellen	Co-Rezeptor für B-Zellen
CD25	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	α -Kette des IL-2 Rezeptors
CD27	T-Zellen, NK-Zellen, einige B-Zellen	TNF-Rezeptor, bindet CD70; kann bei T- und B-Zellen als Co-Stimulator wirken
CD45	Alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosinphosphatase; erhöht die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen;

		durch alternatives Spleißen entstehen viele Unterformen
CD56	NK-Zellen, einige aktivierte T-Zellen	Isoform der neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM), Adhäsionsmolekül
γ/δ TCR	γ/δ T-Zellen	MHC-unabhängige Erkennung von Molekülen

3.8.5 Gatingstrategie Sputum

Für die Differenzierung der Sputumzellen in der Durchflusszytometrie wurden diese mittels acht fluoreszierender Antikörper gegen verschiedene CD-Marker gefärbt (siehe Tabelle 7 und 10). Die Färbung zu den PBMCs erfolgte analog. Die gleiche Färbemethodik ist eine Voraussetzung für die Vergleichbarkeit zwischen den Matrices. So können die Unterschiede zwischen lokalem und systemischem Geschehen objektiviert werden.

Im Sputum wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen aufgenommen. Das Gating der Durchflusszytometrie-Daten macht ein „Ausgießen“ der gesuchten Subpopulationen möglich. Im ersten Schritt wurden aus der Gesamtzahl der gemessenen Zellen das Areal, in welchem die Lymphozyten zu finden sind, ausgewählt, um in einem zweiten Schritt die einzelnen Zellen (Singletten) herauszufiltern. Der Antikörper 7-AAD markiert die abgestorbenen Zellen, wodurch die lebenden Zellen (nicht gefärbt) gated wurden. CD45 ist als Panleukozytenmarker klassifiziert. Die mittels CD45+ Antikörper gefärbten Zellen konnten in einem vierten Schritt identifiziert werden (siehe Abb. 5, Diagramm 4). Im Sputum zeichnet sich die Lymphozyten-Population deutlich in der Leukozyten Population ab. Daher wurde die Lymphozyten-Population zusätzlich gated um falsch positive Zellen auszuschließen. In den PBMCs fand dieser Schritt nicht statt (siehe 3.8.6 Gating Strategie PBMCs).

3.8.5.1 Allgemeine Gatingstrategie Sputum

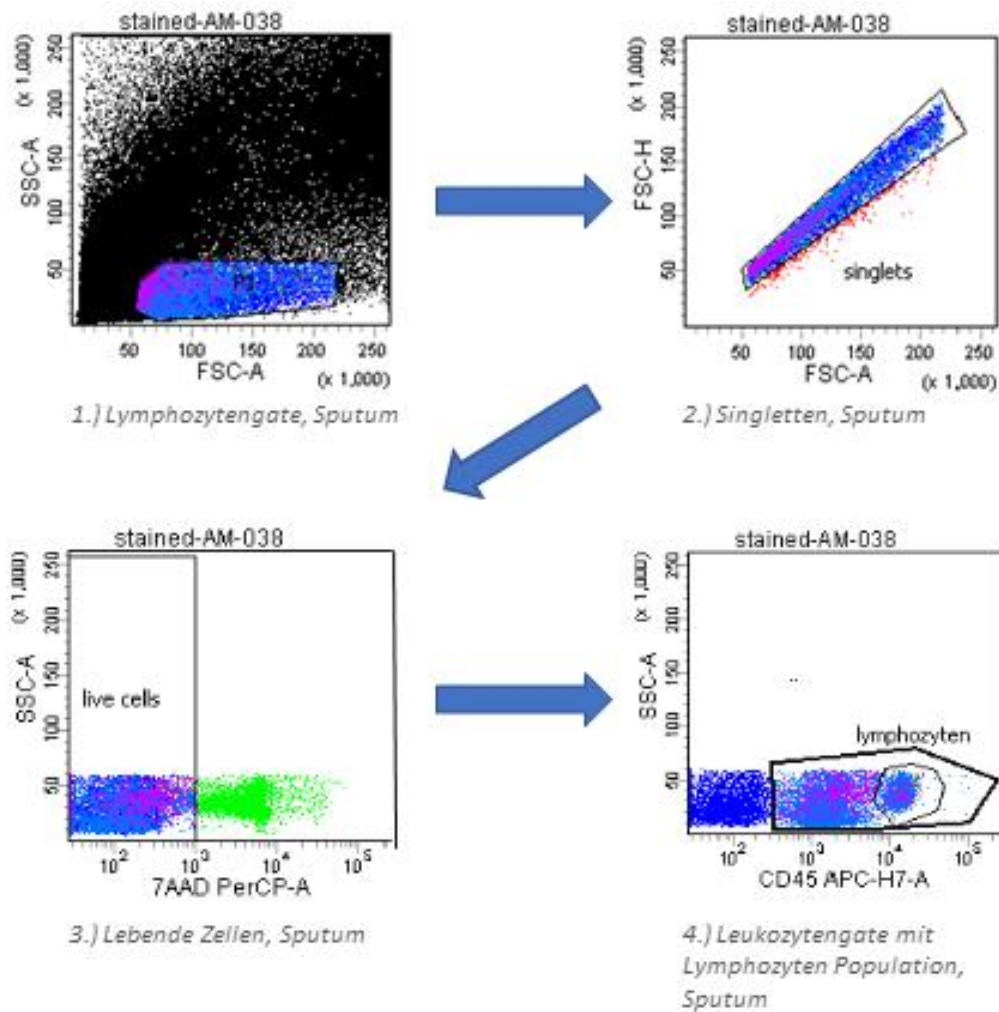


Abbildung 5: Allgemeine Gatingstrategie, Sputum

3.8.5.2 T-Zellpopulationen

Für die Bestimmung der T-Zell Subpopulationen wurden zwei verschiedene Gating-Zweige der allgemeinen Gatingstrategie (siehe oben) nachgestellt.

Im ersten Zweig wurden CD5+ T-Zellen gated und aus dieser Population noch die CD5+/CD3+ T-Zellen bestimmt. Im Diagramm 7 ist die Bestimmung der CD5+/CD3+/CD25+ T-Zellen dargestellt. CD25+ ist ein IL-2 Rezeptor und ein Marker für die Aktivierung der T-Zelle.

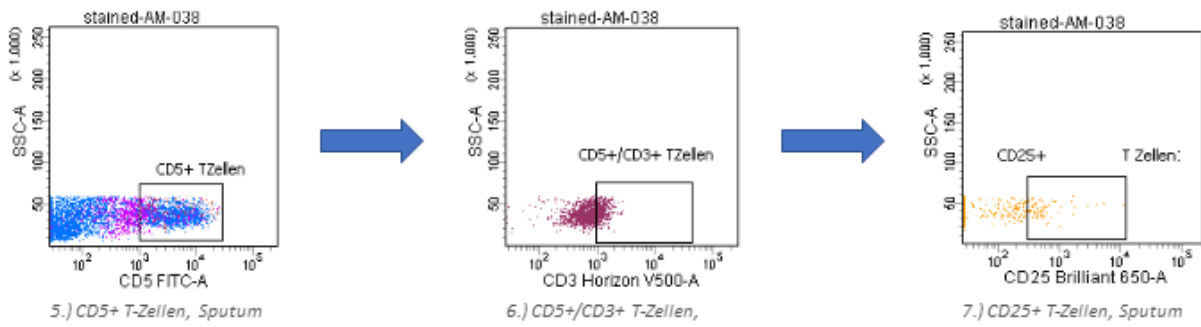


Abbildung 6: Gatingstrategie: CD3+/CD5+ T-Zellen, CD25+ T-Zellen, Sputum

Zur Charakterisierung der γ/δ T-Zellen und deren Subpopulationen wurden zuerst die CD3+ T-Zellen bestimmt. In dieser Zellfraktion wurden die Zellen, welche zusätzlich den γ/δ T-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen gated. In der Population der γ/δ T-Zellen lag der primäre Fokus auf CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen. Diese wurden, wie im Diagramm 10 ersichtlich, charakterisiert. Zusätzlich wurden CD56+ γ/δ T-Zellen differenziert. CD56 ist ein Oberflächen-Marker der natürlichen Killerzelle.

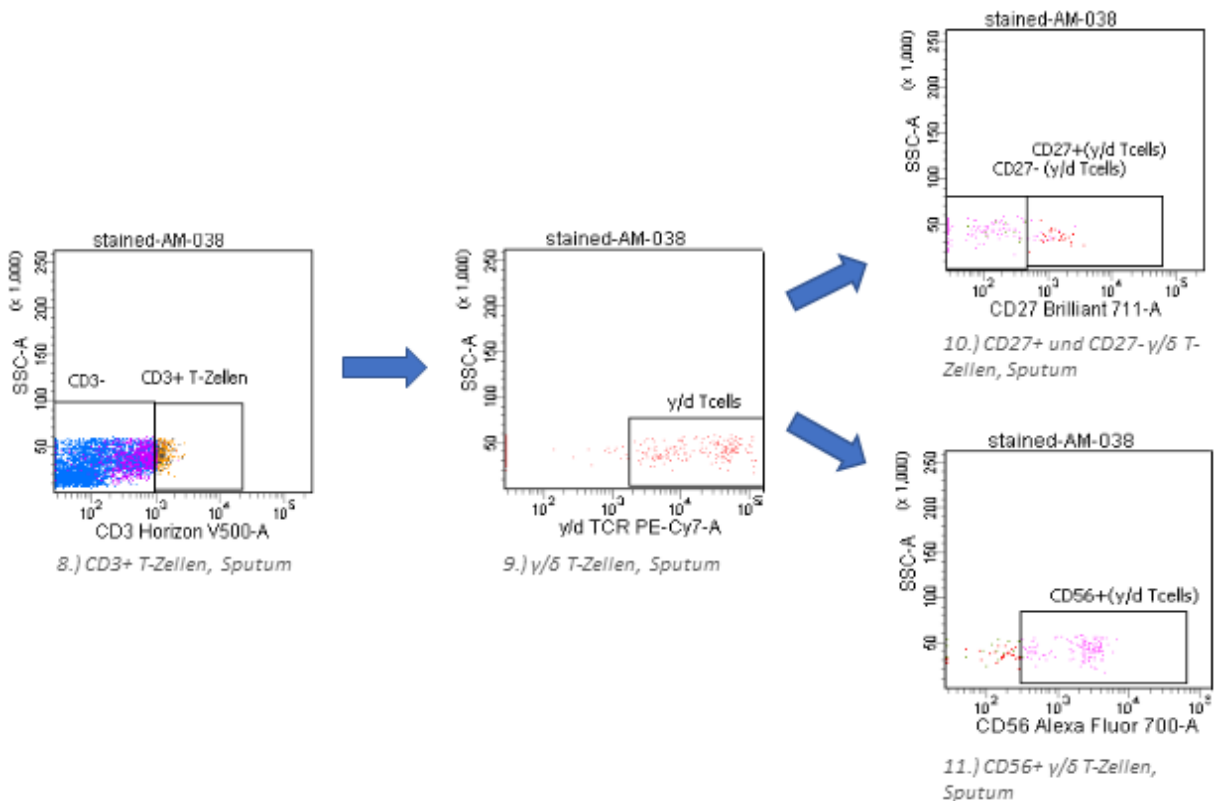


Abbildung 7: Gatingstrategie: γ/δ T-Zellen, CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen, CD56+ γ/δ T-Zellen, Sputum

Die Differenzierung der NKT-like Zellen erfolgte mittels CD3 als T-Zellmarker und CD56+ als Oberflächenmarker für natürliche Killerzellen. CD3+ und CD56+ Zellen wurden als NKT-like Zellen klassifiziert.

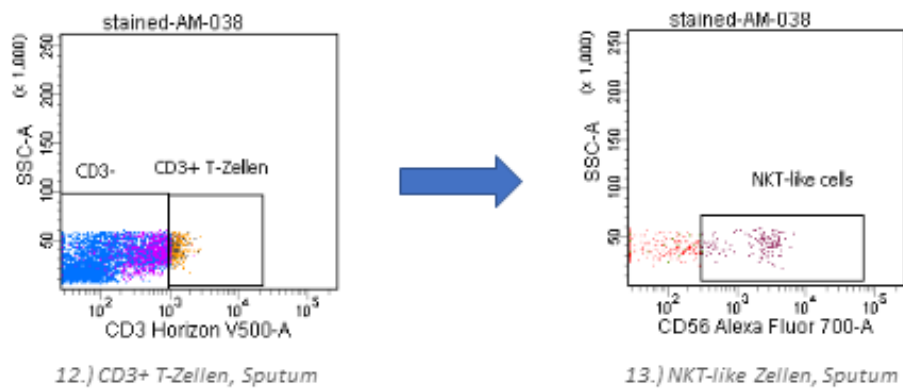


Abbildung 8: Gatingstrategie: NKT-like Zellen, Sputum

3.8.6 Gatingstrategie PBMCs

Die Gatingstrategie der PBMCs entspricht der des Sputums, mit der Ausnahme des Fehlens des Lymphozyten-Gates in der CD45+ Leukozytenpopulation. In den PBMCs ist die Population klar abzugrenzen und die Gefahr falsch positiver Zellen geringer. Deshalb konnte auf das zusätzliche Lymphozytengate verzichtet werden.

3.8.6.1 Allgemeine Gatingstrategie

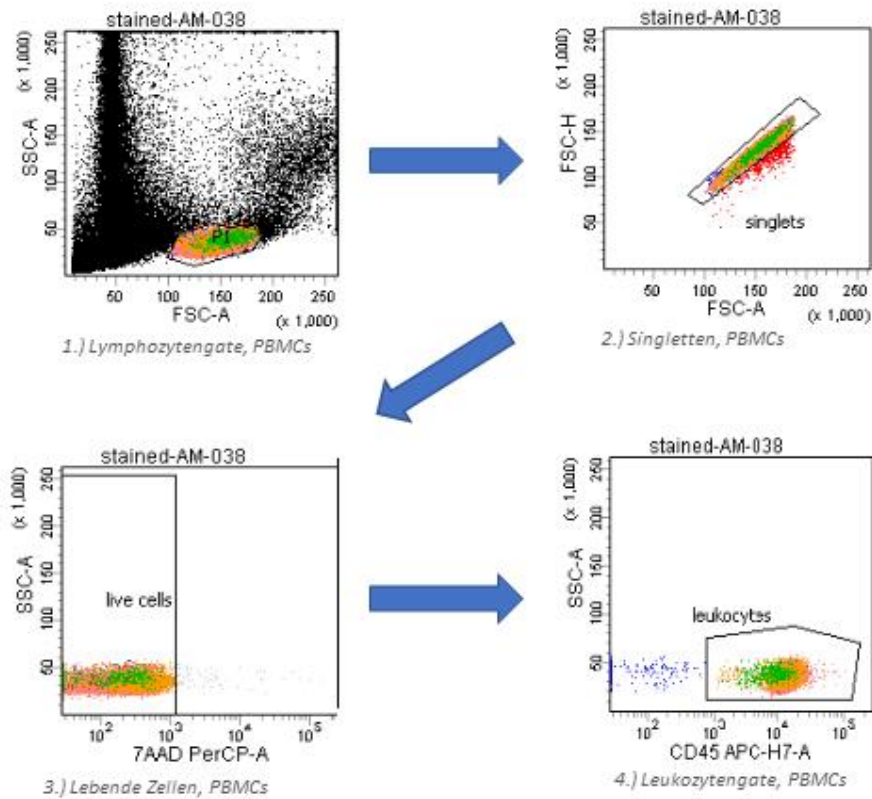


Abbildung 9: Allgemeine Gatingstrategie, PBMCs

3.8.6.2 T-Zellpopulationen PBMCs

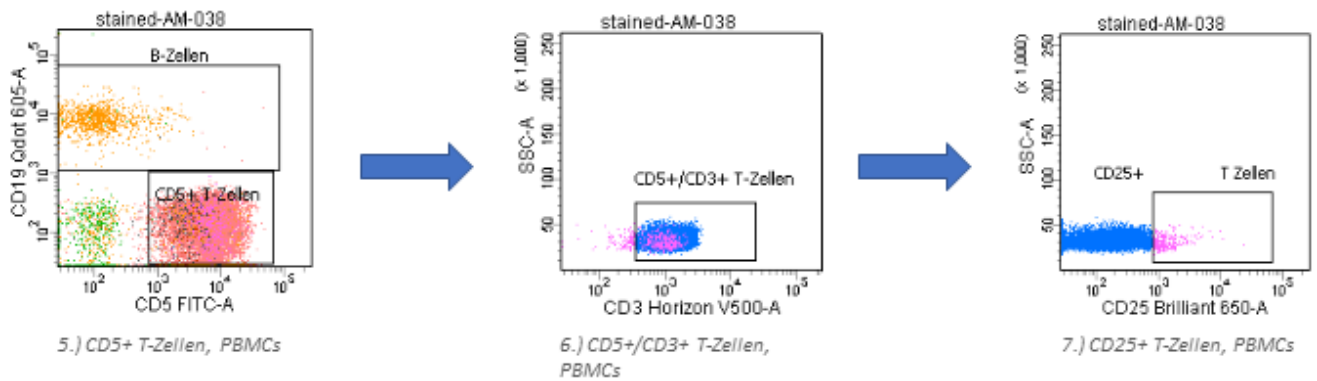


Abbildung 10: Gatingstrategie: CD3+/CD5+ T-Zellen, CD25+ T-Zellen, PBMCs

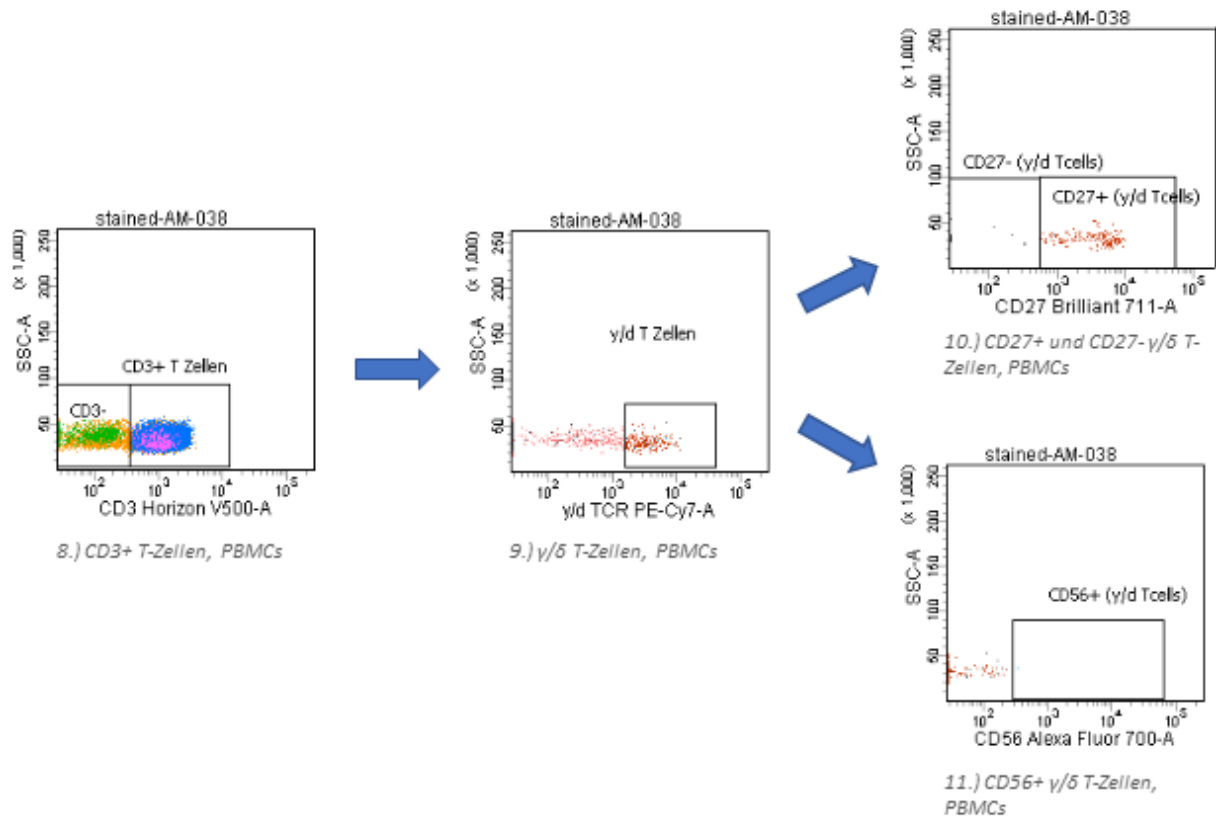


Abbildung 11: Gatingstrategie: γ/δ T-Zellen, CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen, CD56+ γ/δ T-Zellen, PBMCs

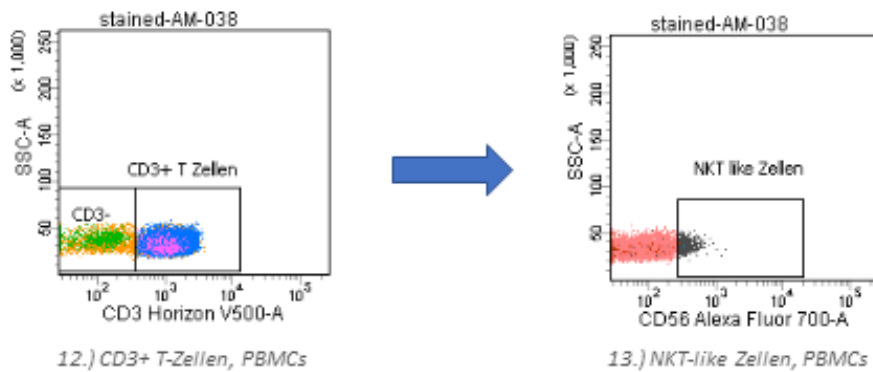


Abbildung 12: Gatingstrategie: NKT-like Zellen, PBMCs

4 Ergebnisse

4.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurde das Programm GraphPadPrism 6.0 verwendet. Die Erstellung der Graphen erfolgte ebenfalls mit GraphPadPrism. Statistische Signifikanz wird in der Beschriftung der Graphen mittels „*“ für $p < 0,05$, „**“ für $p < 0,01$, „***“ für $p < 0,001$, „****“ für $p < 0,0001$ dargestellt.

Zum Vergleich zweier Gruppen wurde ein Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die Daten wurden visuell inspiziert, wobei sich keine Normalverteilung zeigte. Daher wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und in den Graphen die Mediane der Gruppen sowie die einzelnen Datenpunkte gezeigt.

Handelte es sich um Daten, die bei denselben Probanden sowohl In-Season als auch Off-Season erhoben wurden, wurde ein Test für abhängige Stichproben verwendet. Da keine Normalverteilung in den Daten vorlag und zudem einzelne Gruppen geringe Stichprobengrößen aufwiesen, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet.

Es erfolgte der Vergleich der einzelnen T-Zell-Subpopulationen In-Season und Off-Season zwischen induziertem Sputum und PBMCs innerhalb der Kohorten. Zusätzlich wurden die Kohorten der Kontrollen, Allergiker ohne Immuntherapie und Allergiker mit Immuntherapie im Gruppenvergleich sowie im Untergruppenvergleich die Probanden mit allergischer Rhinitis ohne Immuntherapie, Probanden mit allergischer Rhinitis mit Immuntherapie, Probanden mit allergischem Asthma ohne Immuntherapie und Probanden mit allergischem Asthma mit Immuntherapie untereinander verglichen

Um Zusammenhänge zwischen klinischen Daten und gemessenen Zellpopulationen zu beschreiben, erfolgte eine Korrelationsanalyse. Da die Voraussetzungen für die Anwendung des parametrischen Pearson-Korrelationskoeffizienten nicht gegeben waren, wurden alle Korrelationen anhand der Rangkorrelation nach Spearman berechnet. Die Effektstärke wurde nach dem Standard von Cohen bewertet. Korrelationskoeffizienten zwischen 0,10 und 0,29 zeigen einen geringen Zusammenhang, Koeffizienten zwischen 0,30 und 0,49 zeigen einen mittleren Zusammenhang und Koeffizienten von $> 0,50$ einen starken Zusammenhang (Cohen 1992; Soutions 2022).

Abbildung 13 zeigt die schematische Darstellung der Gatingstrategie in der Durchflusszytometrie (FACSDiva). Die gemessenen Zellen wurden in absoluten Zahlen (#Event) und in ihrem prozentualen Anteil an der übergeordneten Zellpopulation (%Parent) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Werten des %Parent.

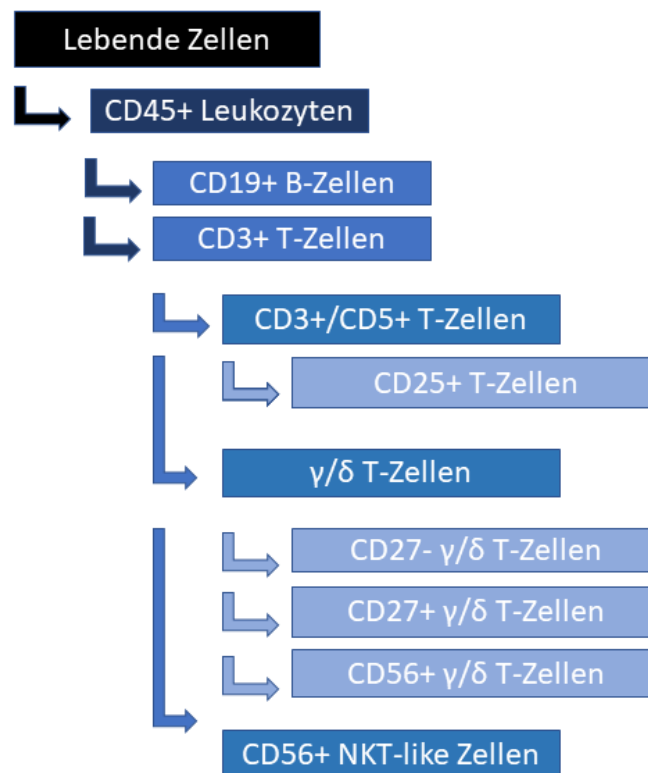


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gatingstrategie

4.2 Klinische Daten

Tabelle 11: Klinische Daten und Sputumzellzahl / ml (Mean \pm SEM)

	Kontrollen i.s.	Kontrollen o.s.	A-AIT i.s.	A-AIT o.s.	A+AIT i.s.	A+AIT o.s.
Anzahl [n]	n=21	n=21	n=18	n=17	n=18	n=17
Asthmatiker	0/21	0/21	6/18	6/17	7/18	7/17
Alter [Jahre]	23,2 \pm 0,5		25,8 \pm 1,0		28,3 \pm 1,7	
BMI [kg/m ²]	21,8 \pm 0,7		22,3 \pm 0,9		23,0 \pm 0,6	
Geschlecht (f/m)	16/5	16/5	11/7	10/7	6/12	6/11
FEV1 [L]	3,8 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2	3,9 \pm 0,1	4,0 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2
FVC [L]	4,5 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2
Tiffeneau- Index [%]	85,7 \pm 1,8	84,1 \pm 1,9	86,2 \pm 1,5	87,1 \pm 2,7	88,7 \pm 2,2	85,2 \pm 2,0
Sputum- zellzahl/ml	51,3 \pm 10,0	60,2 \pm 14,1	59,0 \pm 12,5	34,9 \pm 6,5	76,9 \pm 13,9	63,0 \pm 10,7

Tabelle 11 liefert eine Übersicht der deskriptiven Teststatistik relevanter soziodemographischer und klinischer Kennwerte der Probandenkohorte.

Das mittlere Alter der Probanden zu Beginn unsere Studie betrug 25,6 Jahre (Min. 20 Jahre, Max. 49 Jahre, Median 24 Jahre). Die Geschlechterverteilung lag bei 42,1% Männern und 57,9% Frauen.

In der Spirometrie wurden das forcierte Einsekundenvolumen (FEV1) und die forcierte Vitalkapazität (FVC) bestimmt. Das FEV1 gibt an, wie viel Volumen der Proband in einer Sekunde maximal ausatmen kann und wird in Litern angegeben. Die FVC bezeichnet die Summe des maximalen Ein- und Ausatemvolumens in Litern. Aus diesen zwei Werten lässt sich der Tiffeneau-Index errechnen [FEV1/FVC], dieser wird in Prozent angegeben. Der Tiffeneau-Index ist ein Maß für die Obstruktion der Atemwege, von welcher ab einem Index von <70% die Rede ist. In den Ergebnissen der Spirometrie bestehen zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

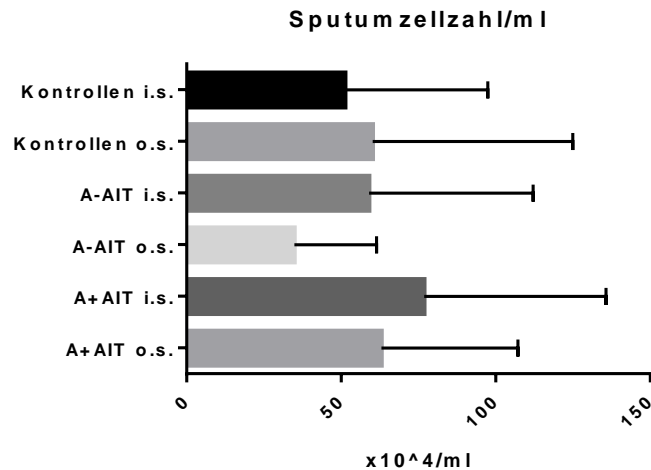


Abbildung 14: Sputumzellzahl pro ml

Betrachtet man die Sputumzellzahl pro ml, so fallen in der Gruppe der Allergiker (A-AIT i.s. Median 42,25%, A+AIT i.s. Median 63,50%) In-Season höhere Zellzahlen als Off-Season auf (A-AIT o.s. Median 33,00%, A+AIT o.s. Median 53,50%). Diese Unterschiede sind nur als Trend sichtbar (A-AIT i.s. vs. o.s., $p=0,067$; A+AIT i.s. vs. o.s., $p=0,541$). Dieses Ergebnis passt zu der inflammatorischen Reaktion von Allergikern während der Pollenflugsaison.

4.2.1 Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire - Vergleiche und Korrelationen

Der Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire ist ein Test zur Objektivierung der Einschränkung der Lebensqualität durch allergische Rhinitis. Je höher die Punktezah des MiniRQLQs, desto höher der Grad an Einschränkung der Lebensqualität (Juniper et al. 2000).

Im Folgenden werden die Werte des MiniRQLQs von Allergikern in der Allergiesaison und außerhalb dieser verglichen.

Zusätzlich wurden die Zusammenhänge von MiniRQLQ mit der Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Sputum der Probanden und mit der Höhe der Gesamt-IgE Level im Serum untersucht. Dies erfolgte mittels Korrelation (Spearman Korrelationskoeffizient).

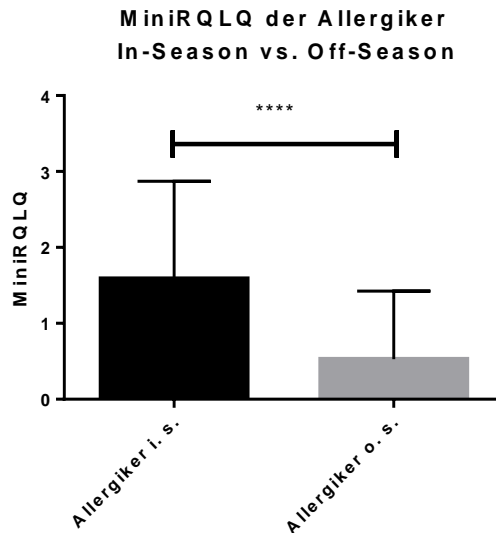


Abbildung 15: Ergebnisse des MiniRQLQ

In Abbildung 15 zeigte sich, dass Allergiker In-Season stärker in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sind als außerhalb der Pollenflugsaison (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0,0001$).

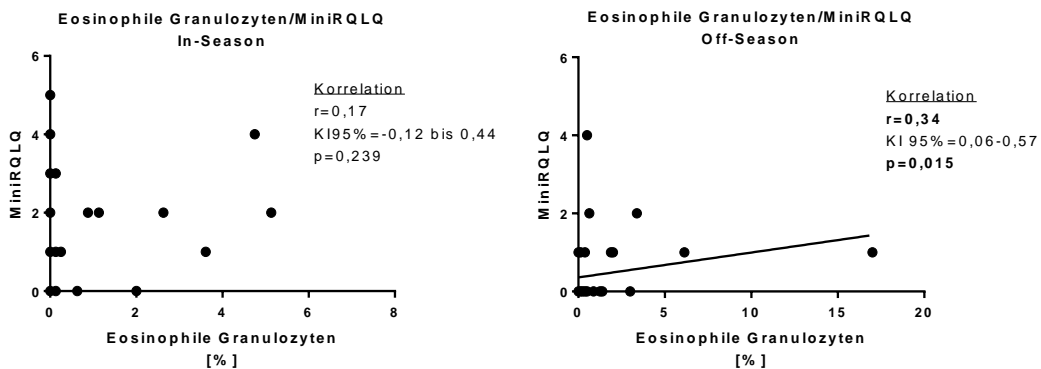


Abbildung 16: Korrelation des MiniRQLQ mit der Anzahl [%] der eosinophilen Granulozyten im Sputum (Zytospins)

Betrachtet man den relativen Anteil der eosinophilen Granulozyten aller Probanden mit dem Score des MiniRQLQ, so ergibt sich in der Off-Season eine positive Korrelation, die einen mittleren Zusammenhang zeigt ($r=0,34$, $p=0,015$). In der Allergiesaison sieht man eine Korrelation nur noch als Trend ($r=0,17$, $p=0,239$)

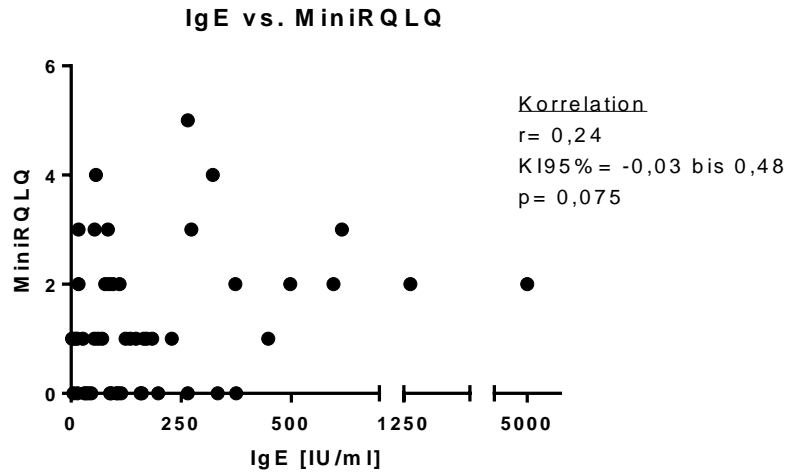


Abbildung 17: Korrelation MiniRQLQ in Summe mit IgE Leveln im Serum

Die Korrelation der im Serum gemessenen Konzentration an Gesamt-IgE [IU/ml] mit der Summe des MiniRQLQ ist in Abbildung 17 dargestellt. Personen, die eine höhere Konzentration von Gesamt-IgE aufwiesen, gaben im MiniRQLQ höhere Werte an, wobei der Zusammenhang allerdings nicht signifikant war (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=0,24$; $p > 0,05$).

4.3 Zelldifferenzierung - Auswertung der Zytospins

Tabelle 12: Zytospins - Zellverteilung im Sputum bei Kontrollen und Allergikern; In-Season und Off-Season

	Kontrollen i.s. (n=17)	Allergiker i.s. (n=34)	p- Wert	Kontrollen o.s. (n=19)	Allergiker o.s. (n=32)	p-Wert
Makrophagen [%]	87.32 [33.75-99.75]	89.28 [29.38- 100.00]	n.s.	82.79 [35.50-99.13]	83.70 [37.13- 99.63]	n.s.
Neutrophile [%]	10.87 [0.13-62.75]	8.52 [0.00-70.38]	n.s.	14.92 [0.42-64.25]	14.55 [0.25-60.00]	n.s.
Lymphozyten [%]	1.76 [0.13-3.50]	1.54 [0.00-4.00]	n.s.	2.15 [0.00-28.67]	0.50 [0.00-3.13]	n.s.
Eosinophile [%]	0.06 [0.00-0.88]	0.61 [0.00-5.13]	p<0.05	0.11 [0.00-1.25]	1.21 [0.00-17.00]	p<0.005
Basophile [%]	0.00 [0.00-0.00]	0.04 [0.00-0.41]	n.s.	0.03 [0.00-0.50]	0.04 [0.00-0.38]	n.s.

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung von Sputumzellen in den Zytospins. Die Zellverteilung wurde bei Allergikern und Kontrollen in und außerhalb der Allergiesaison ausgewertet. Aufgelistet werden die Mittelwerte mit jeweiligen Minima und Maxima in den eckigen Klammern. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Tests.

Die Normwerte für die Zellverteilung im Sputum wurden von UM Zissler wie in Tabelle 13 dargestellt in seiner Dissertation festgelegt (Zissler 2012).

Tabelle 13: Normwerte für Zellverteilung im Sputum (Zissler 2012)

Alveolarmakrophagen	57-80%
Neutrophile Granulozyten	< 35%
Eosinophile Granulozyten	< 2%
Lymphozyten	< 3%

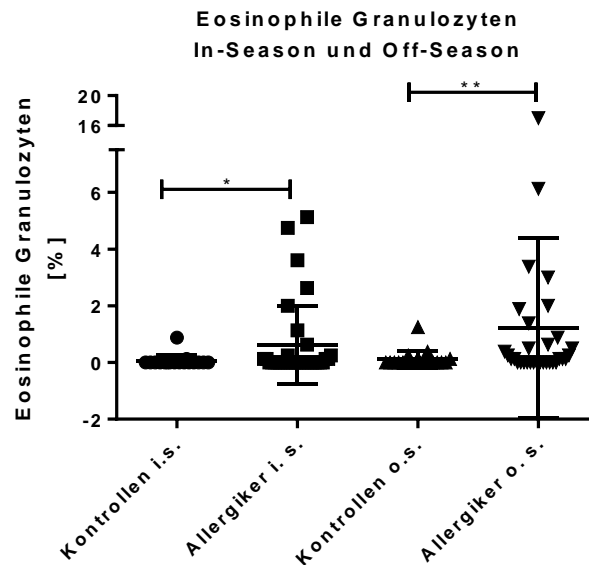


Abbildung 18: Eosinophile Granulozyten im Sputum. Unterschiede zwischen In-Season und Off-Season und zwischen Kontrollen und Allergikern.

Die statistische Auswertung der eosinophilen Granulozyten in den Zytospins zeigt einen signifikant höheren Prozentsatz in allergischen Probanden verglichen mit gesunden Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test In-Season $p < 0,05$; Off-Season $p < 0,01$). Dieses Ergebnis entspricht der Pathophysiologie von allergischen Atemwegserkrankungen. Hierbei spielen eosinophile Granulozyten eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen (siehe Einleitung). In der Gruppe der Allergiker zeigte sich kein signifikanter Unterschied In-Season vs. Off-Season (Mann-Whitney-U-Test $p > 0,05$). Der Median liegt In-Season niedriger als Off-Season (Median 0,00% vs. Median 0,13%).

4.4 Durchflusszytometrie Daten

4.4.1 Unterschiede zwischen den Matrices

Die unterschiedlichen Zellphänotypen wurden mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Die Bestimmung der prozentualen Anteile erfolgte im Sputum und in aus Blut gewonnenen PBMCs. Diese zwei Untersuchungsmatrices weisen unterschiedliche Verteilungsmuster auf. In den Diagrammen werden die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellart in PBMCs und Sputum in und außerhalb der Pollenflugsaison verglichen. Für den Vergleich zwischen PBMCs und Sputum

innerhalb der fünf Probandengruppen, bestehend aus Kontrollen, AR-AIT, AR+AIT, AA-AIT und AR+AIT, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. In den Graphen stellt jeder Proband einen Punkt dar und es werden die Mediane der Gruppen abgebildet.

Tabelle 14 gewährt einen Überblick über die Zellpopulationsanteile in den Matrices PBMCs und Sputum.

Tabelle 14: Mittelwerte und SEM aller Probanden, errechnet für In- und Off-Season

Mittelwert und SEM für In- und Off-Season errechnet	PBMCs	Sputum
CD5+/CD3+ Zellen	65,8% ± 1,3%	3,6% ± 0,3%
CD25+ T-Zellen	1,9% ± 0,1%	18,6% ± 1,3%
γ/δ T-Zellen	0,9% ± 0,1%	65,6% ± 2,3%
CD27+ γ/δ T-Zellen	57,7% ± 2,6%	17,3% ± 1,4%
CD27- γ/δ T-Zellen	41,4% ± 2,6%	81,9% ± 1,6%
NKT-like Zellen	2,3% ± 0,3%	35,2% ± 2,5%

4.4.1.1 T-Zellen

CD5+/CD3+ T-Zellen

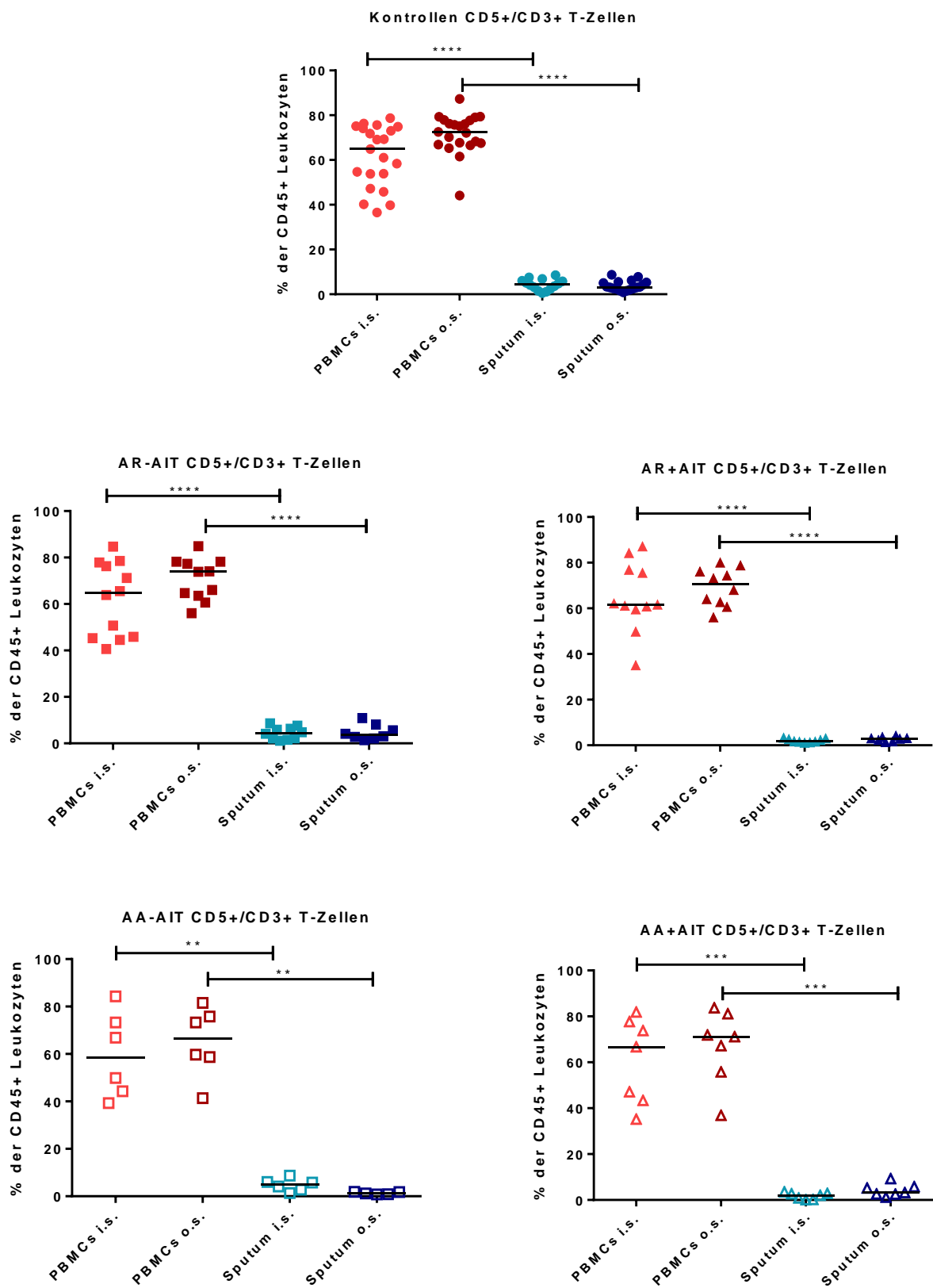
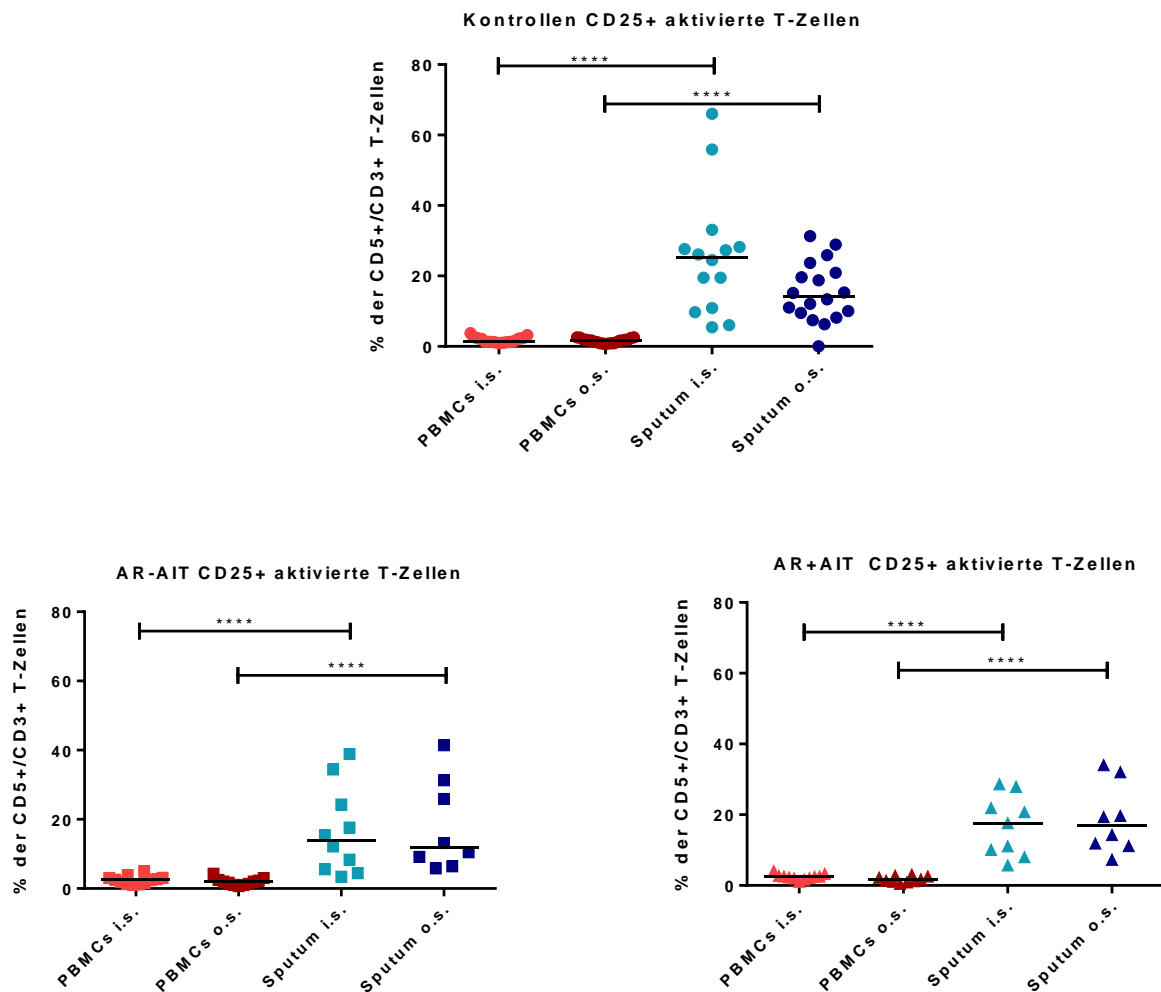


Abbildung 19: Verteilung CD5+/CD3+ T-Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen

In Abbildung 19 ist die relative Anzahl mit Medianen der CD5+/CD3+ T-Zellen in den PBMCs und Sputum dargestellt. In allen fünf Probandengruppen (Kontrollen, AR-AIT, AR+AIT, AA-AIT, AA+AIT) findet sich ein signifikant höherer Anteil an T-Zellen in den PBMCs als im Sputum. Dieser Effekt ist sowohl im In-Season Vergleich als auch Off-Season Vergleich zu sehen (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,01$).

CD25+ T-Zellen



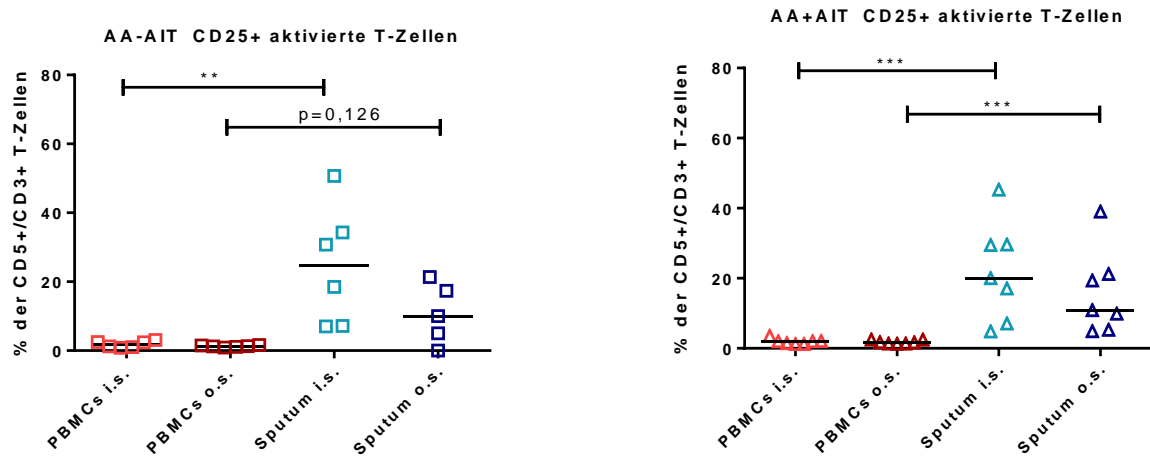


Abbildung 20: Verteilung CD25+ T-Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen

Betrachtet man die einzelnen Probandengruppen in Abbildung 20, ist in allen Gruppen die relative Zellzahl der CD25+ T-Zellen im Sputum signifikant höher als in den PBMCs (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,01$).

Eine Ausnahme stellt der Vergleich PBMCs o.s (Median 1,25%) vs. Sputum (Median 10,00%) o.s. in der Gruppe AA-AIT dar: Hier zeigt sich der Effekt nur als Trend ($p=0,126$).

4.4.1.2 γ/δ T-Zellen

γ/δ T-Zellen

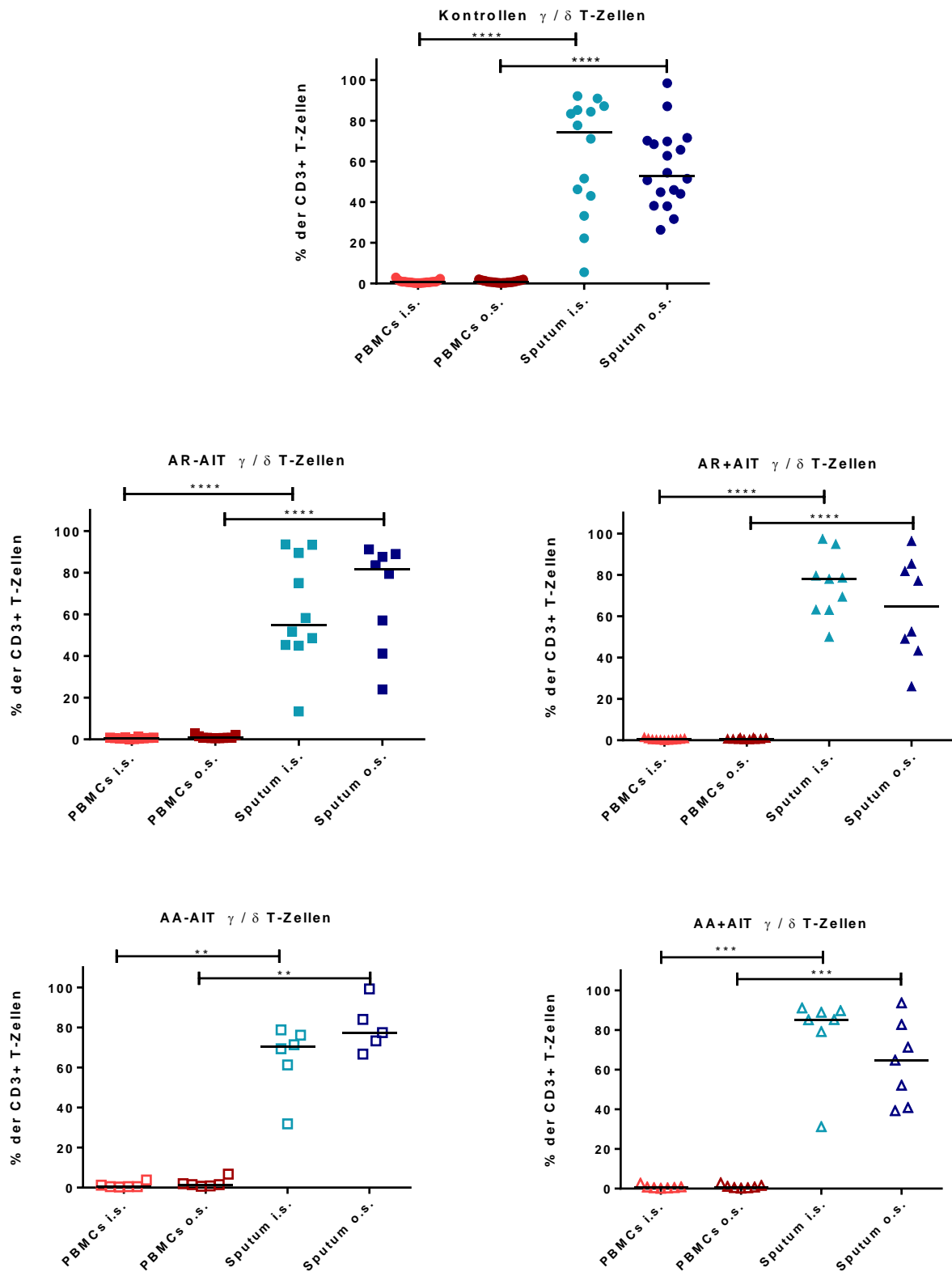


Abbildung 21: Verteilung von γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen

In Abbildung 21 wird die Verteilung von γ/δ T-Zellen mit den jeweiligen Medianen in den unterschiedlichen Probandengruppen dargestellt. Der Unterschied der relativen γ/δ T-Zellanzahl in PBMCs und Sputum ist In- und Off-Season statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,01$). Die Population der γ/δ T-Zellen ist im peripheren Blut wenig bis gar nicht repräsentiert (PBMCs, drei Probanden 0%). Im Vergleich dazu haben γ/δ T-Zellen einen hohen Anteil an den CD5+/CD3+ T-Zellen im Sputum. Diese Diagramme weisen darauf hin, dass Sputum eine geeignete Matrix ist, um γ/δ T-Zellen in Bezug auf allergische Erkrankungen der Atemwege zu untersuchen.

CD 27- γ/δ T-Zellen und CD 27+ γ/δ T-Zellen

In den folgenden Abbildungen (22, 23, 24) wird der relative Anteil an CD 27- γ/δ T-Zellen (links) dem relativen Anteil an CD27+ γ/δ T-Zellen (rechts) gegenübergestellt. In den Diagrammen sind jeweils die Mediane der Zellpopulation eingezeichnet.

CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in der Kontrollgruppe

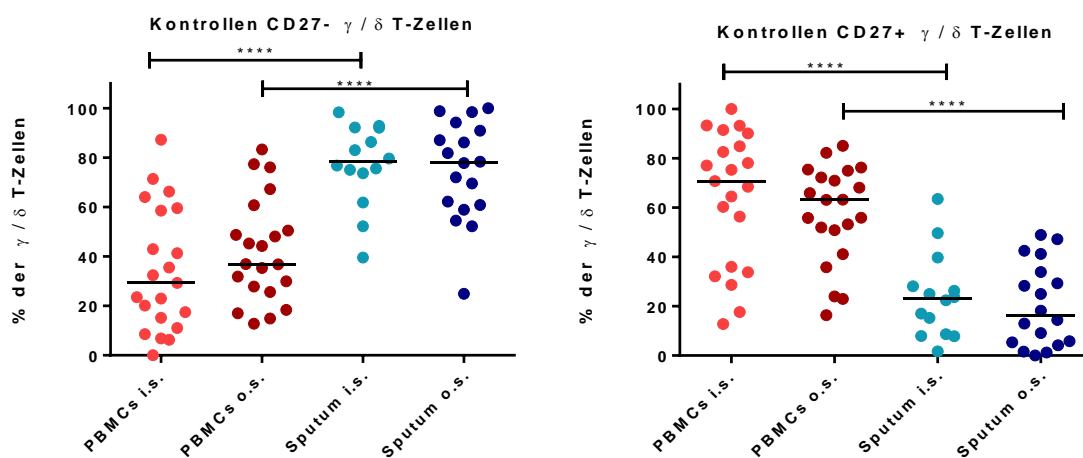


Abbildung 22: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, Kontrollen

In der Kontrollgruppe zeigt die CD27- γ/δ T-Zellpopulation einen signifikant höheren Anteil im Sputum im Vergleich zu den PBMCs (Median PBMCs i.s.=29,30%, Median Sputum i.s.=78,20% / Median PBMC o.s.=36,90%, Median Sputum i.s.=78,05%, $p < 0,0001$ im Mann-Whitney-U-Test).

Die CD27+ γ/δ T-Zellpopulation wiederum hat signifikant höheren Anteil an den PBMCs im Vergleich zum Sputum (Median PBMC i.s.=70,70%, Median Sputum

i.s.=23,05%/ Median PBMC o.s.=63,10%, Median Sputum i.s.=16,30%, $p > 0,0001$ im Mann-Whitney-U-Test).

Im Folgenden wird dieses Phänomen als CD27-/CD27+ γ/δ T-Zell-Inversion bezeichnet.

- 1) CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen der Gruppe allergischer Rhinitiker (AR) ohne (-) und mit (+) Immuntherapie (AIT)

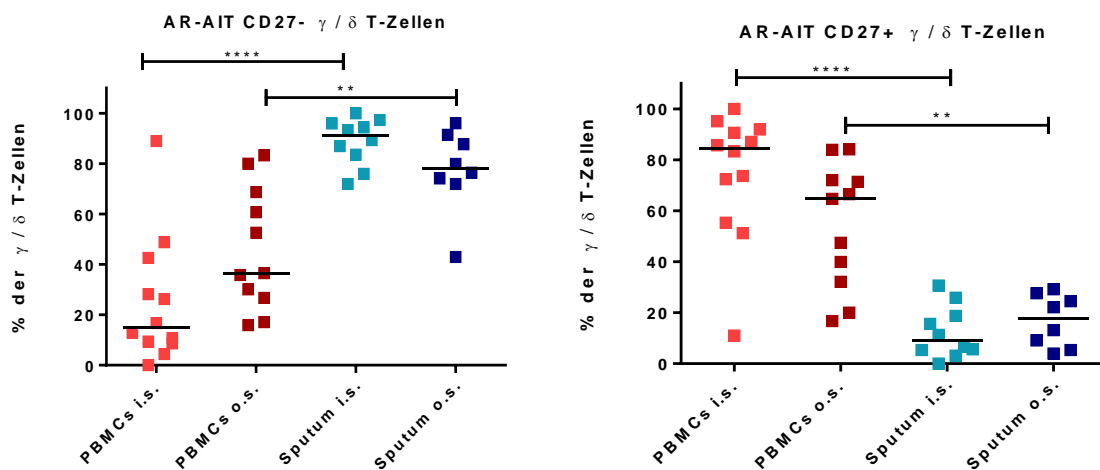


Abbildung 23: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Rhinitiker ohne Immuntherapie

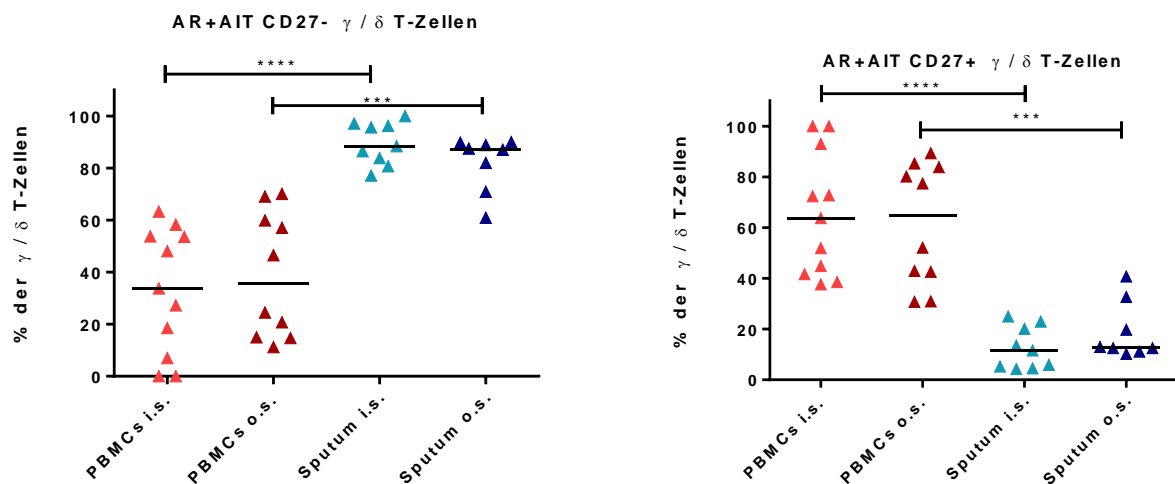


Abbildung 24: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Rhinitiker mit Immuntherapie

Betrachtet man die Gruppe der allergischen Rhinitiker mit und ohne Immuntherapie, ist hier dieselbe CD27-/CD27+ γ/δ T-Zell-Inversion zu finden wie in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen PBMCs und Sputum sind sowohl für CD27- als auch für

CD27+ γ/δ T-Zellen in beiden Seasons signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,0001$, $p < 0,001$)

2) CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen der Gruppe allergischer Asthmatiker (AA) ohne (-) und mit (+) Immuntherapie (AIT)

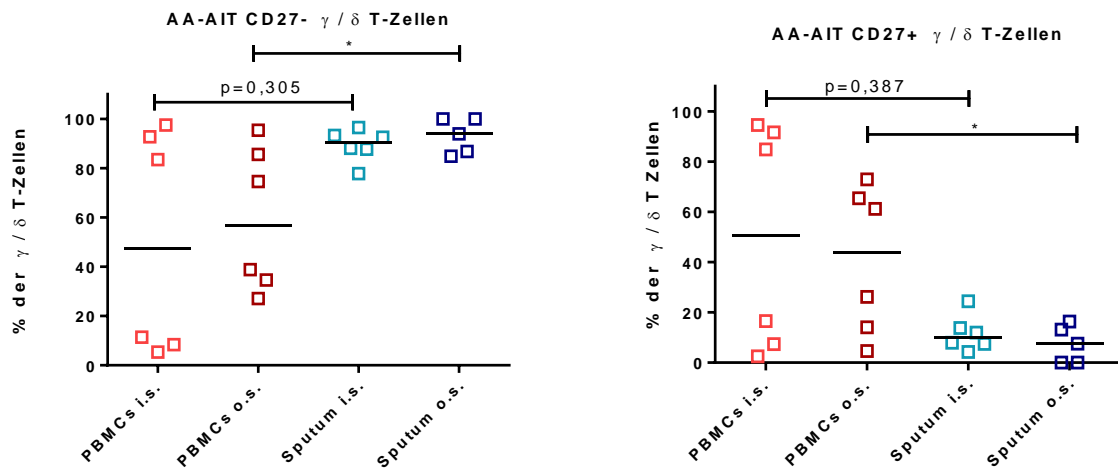


Abbildung 25: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Asthmatiker ohne Immuntherapie

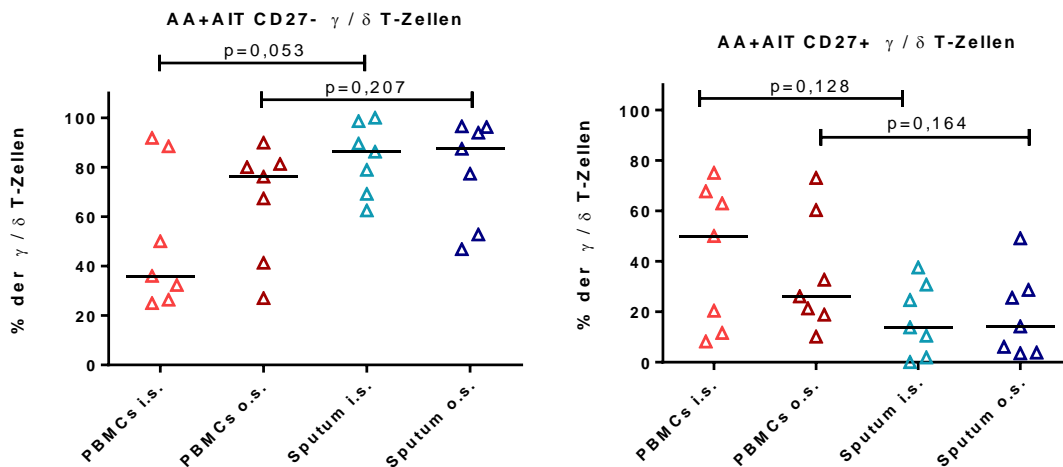


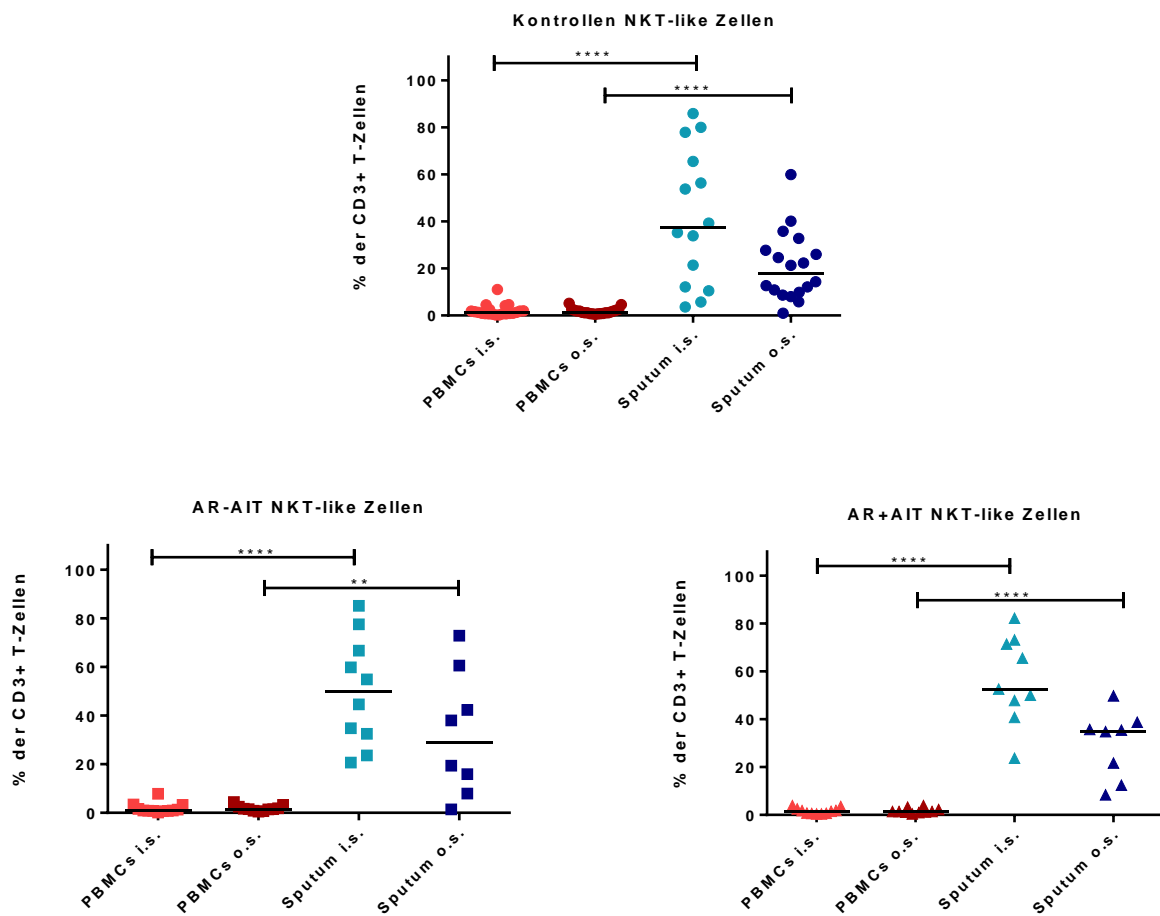
Abbildung 26: Verteilung von CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in PBMCs und Sputum, allergische Asthmatiker mit Immuntherapie

Wie in den Abbildungen 25 und 26 ersichtlich, zeigt sich in der Probandengruppe mit allergischem Asthma die CD27-/CD27+ γ/δ T-Zell-Inversion zwischen PBMCs und Sputumzellen nur noch als Trend (AA-AIT: CD27- γ/δ T-Zellen - PBMCs i.s. vs. Sputum i.s., $p=0,305$ / CD27+ γ/δ T-Zellen - PBMCs i.s. vs. Sputum i.s., $p=0,387$) (AA+AIT: CD27- γ/δ T-Zellen - PBMCs i.s. vs. Sputum i.s., $p=0,053$; PBMCs o.s. vs. Sputum

o.s., $p=0,021$ / CD27+ γ/δ T-Zellen - PBMCs i.s. vs. Sputum i.s., $p=0,128$; PBMCs o.s. vs. Sputum o.s., $p=0,164$).

Ausnahmen bilden die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests Off-Season bei CD27- und CD27+ γ/δ T-Zellen in der Gruppe der Asthmatiker ohne Immuntherapie (AA-AIT-Abbildung 25). Diese weisen einen p-Wert von < 0.05 auf und sind somit signifikant.

4.4.1.3 NKT-like Zellen



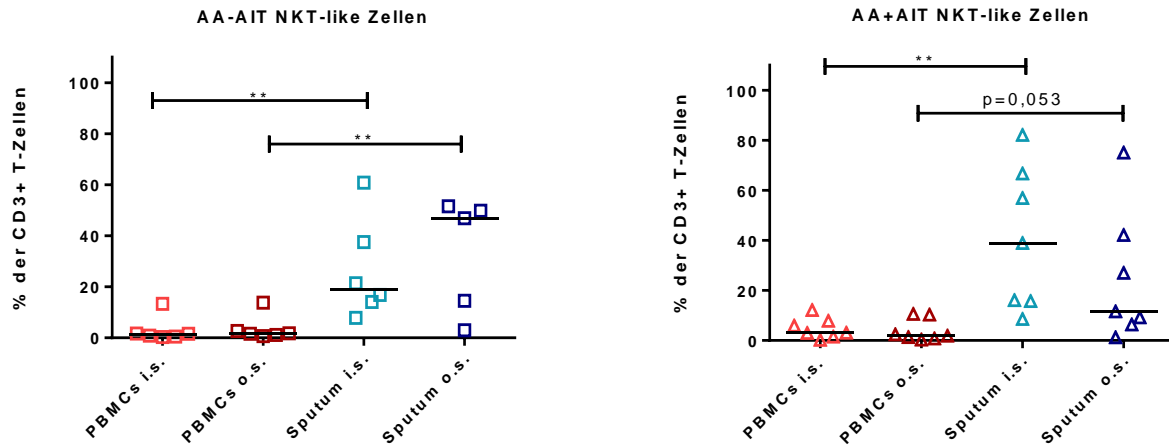


Abbildung 27: Verteilung von NKT-like Zellen in PBMCs und Sputum, alle Untergruppen

Statistisch signifikante Unterschiede der prozentualen NKT-like Zellzahl zeigen sich in allen Probandengruppen (Kontrollen, AR-AIT, AR+AIT, AA-AIT, AA+AIT). In den Sputumproben ist der Anteil an NKT-like Zellen in der CD3+ T-Zellpopulation im Vergleich zu den PBMCs erhöht. Dieser Effekt ist am deutlichsten in den Kontrollen, AR-AIT und AR+AIT ($p < 0,0001$; $p < 0,01$) zu sehen.

Betrachtet man die Gruppen der Asthmatiker AA-AIT und AA+AIT, so nimmt die Signifikanz etwas ab ($p < 0,01$). Off-Season ist bei Asthmatikern mit Immuntherapie ein Unterschied gegeben, der an der Grenze zur Signifikanz liegt (Median PBMCs o.s. 1,9%; Median Sputum o.s. 11,6%, $p=0,053$) und als Trend bezeichnet werden kann.

4.4.2 Phänotypisierung von Sputumzellen in der Durchflusszytometrie

Die Phänotypisierung nach CD-Markern erfolgte identisch für Sputumzellen und PBMCs. Im Folgenden sind die einzelnen T-Zellpopulationen im Sputum auf ihre Unterschiede unter den drei Gruppen – Kontrollen, Allergiker mit Immuntherapie und ohne Immuntherapie – untersucht worden. Anschließend wurde die Gruppe der Allergiker weiter unterteilt in allergische Rhinitiker ohne und mit Immuntherapie (AR-AIT, AR+AIT) und allergische Asthmatiker ohne und mit Immuntherapie (AA-AIT, AA+AIT). Statistisch signifikante Differenzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dies wurde für die Zeit des Pollenflugs (i.s.) und außerhalb der Allergiesaison (o.s.) durchgeführt.

In den Untergruppentests wurden jeweils Gruppen mit denselben Merkmalen mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. AR-AIT vs. AR+AIT, AR-AIT vs. AA-AIT, AR+AIT vs. AA+AIT und AA-AIT vs. AA+AIT.

Die Ergebnisse für die PBMCs befinden sich im Anhang.

4.4.2.1 T-Zellen im Sputum

CD5+/CD3+ T-Zellen im Sputum

Gruppenvergleich

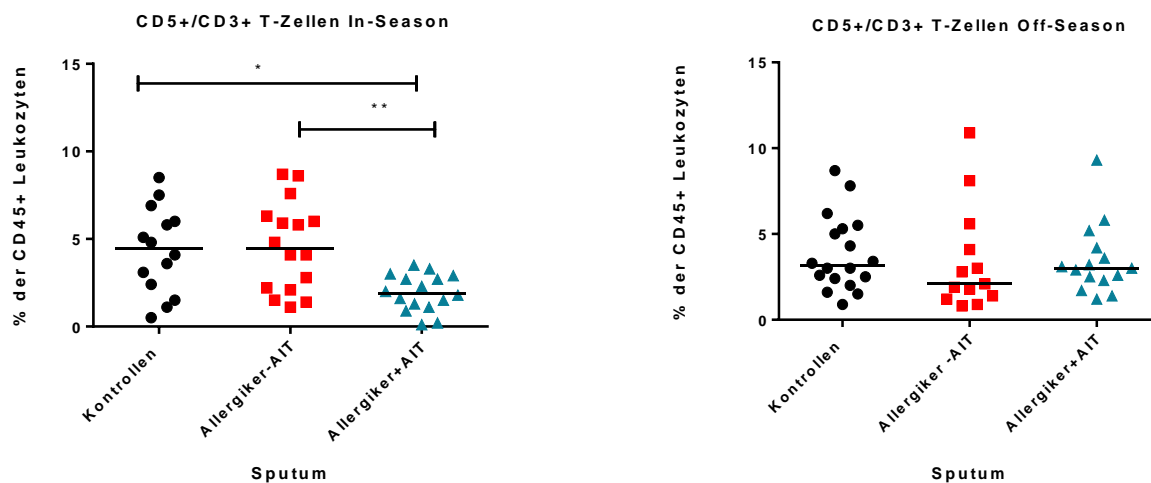


Abbildung 28: Gruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Die zwei Diagramme in Abbildung 28 zeigen die relativen T-Zellzahlen In- und Off-Season. Diese unterscheiden sich in der Allergiesaison zwischen Kontrollen (Median 4,45%), Allergikern-AIT (Median 4,45%) und Allergiker+AIT (Median 1,90%). Statistisch signifikante Unterschiede bestehen zwischen der Kontrollgruppe und den Allergikern mit Immuntherapie (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$) sowie den Allergikern ohne Immuntherapie und den Allergikern mit Immuntherapie (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,01$).

Off-Season bestehen keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen ($p > 0,05$)

Untergruppenvergleich

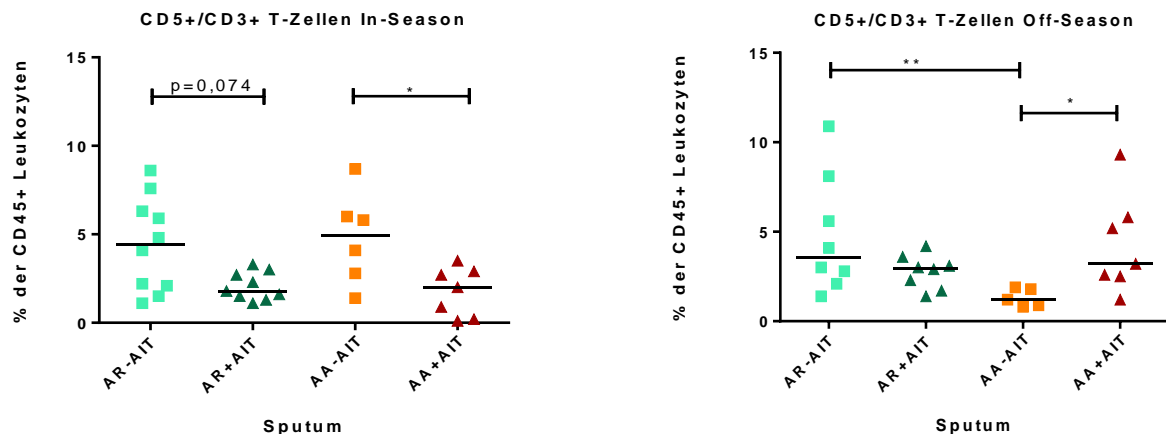


Abbildung 29: Untergruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Im Vergleich der Untergruppen zeigt sich in der Pollenflugsaison in der Gruppe der allergischen Rhinitiker ohne Immuntherapie (AR-AIT) ein Median von 4,45%. In der Gruppe mit Immuntherapie (AR+AIT) liegt der Median bei 1,80%. Somit ist der prozentuale Anteil an CD5+/CD3+ T-Zellen in der Gruppe ohne Immuntherapie (AR-AIT) höher. Dieses Ergebnis ist allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,074$).

Betrachtet man die Probanden mit allergischem Asthma (AA) In-Season, zeigt sich ebenfalls ein höherer relativer Anteil CD5+/CD3+ Zellen in der Gruppe ohne Immuntherapie (AA-AIT, Median 4,95%) verglichen mit der Gruppe mit Immuntherapie (AA+AIT, Median 2,00%). Der Mann-Whitney-U-Test ergibt eine Signifikanz von $p < 0,05$.

Außerhalb der Allergiesaison besteht in der Gruppe der Asthmatiker (AA) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Probanden mit und ohne Immuntherapie, der sich gegenläufig zu dem Ergebnis In-Season verhält. Der relative Anteil an CD5+/CD3+ T-Zellen in der Probandengruppe AA+AIT (Median 3,20%) ist signifikant höher als in AA-AIT (Median 1,20%).

Off-Season zeigt sich zudem ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen AR-AIT (Median 3,55%) und AA-AIT (Median 1,20%) der In-Season nicht besteht.

CD5+/CD3+/CD25+ T-Zellen im Sputum

Gruppenvergleich

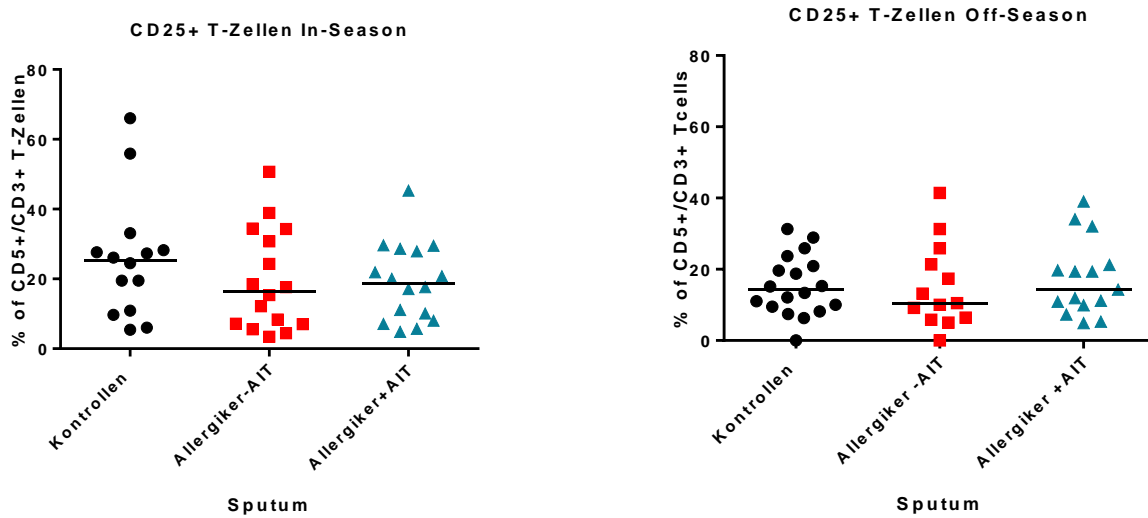


Abbildung 30: Gruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Die CD25+ T-Zellen im Sputum zeigen In-Season und Off-Season keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Untergruppenvergleich

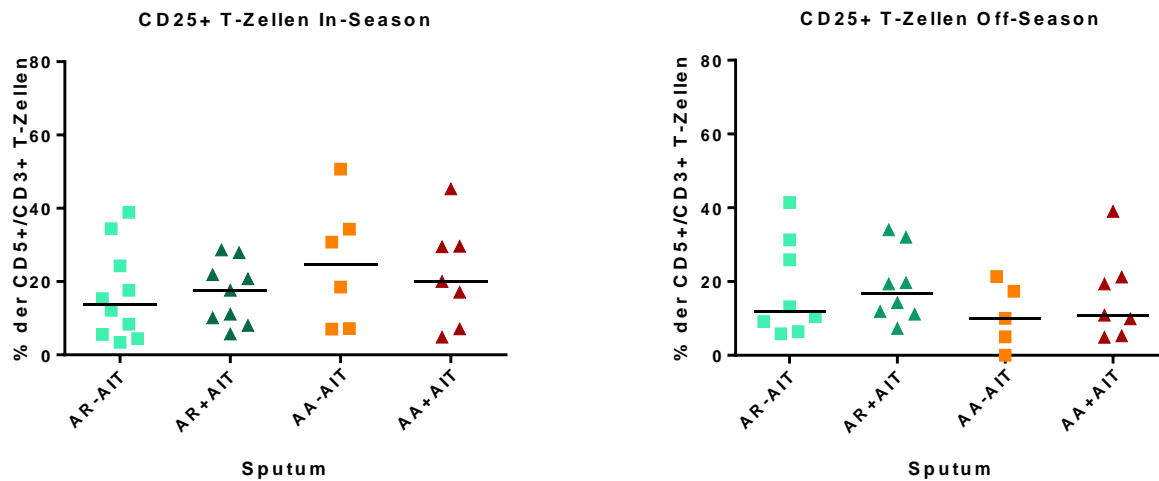


Abbildung 31: Untergruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Die relative Anzahl der CD25+ T-Zellen zeigt zwischen den Untergruppen im Sputum der allergischen Probanden keinen signifikanten Unterschied in und außerhalb der Pollenflugsaison (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

4.4.2.2 γ/δ T-Zellen im Sputum

In der γ/δ T-Zellfraktion wurden zusätzlich CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen unterschieden. Dieser Unterschied im Oberflächenmarker-Phänotyp weist auf die Zytokinproduktion (INF γ oder IL-17) der Zelle hin (siehe Diskussion).

γ/δ T-Zellen

Gruppenvergleich

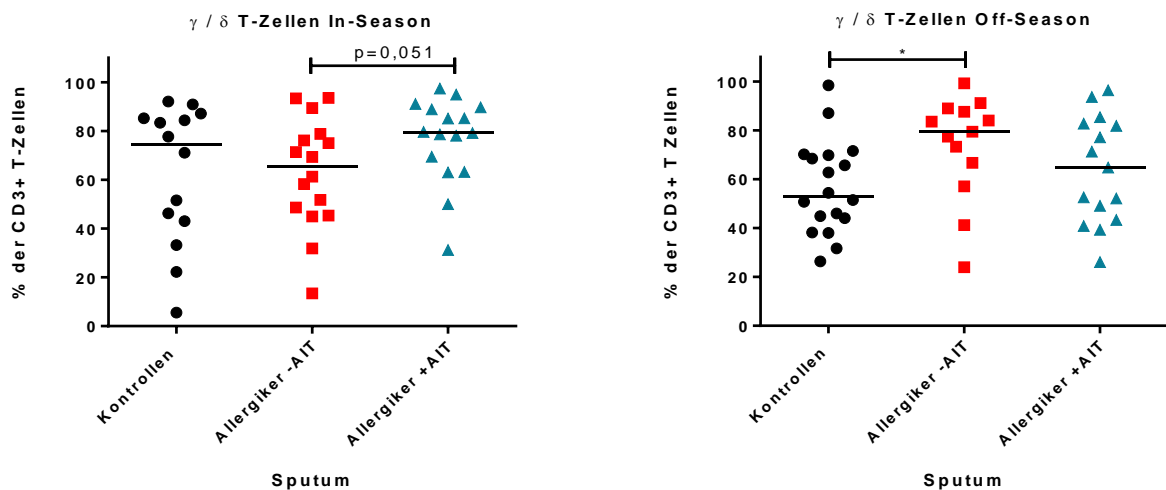


Abbildung 32: Gruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

In-Season zeigt sich eine erhöhte γ/δ T-Zellpopulation in der Gruppe der Allergiker mit Immuntherapie (A+AIT; Median 79,4%) im Vergleich zur Gruppe ohne Immuntherapie (A-AIT; Median 65,3%). Dieser Unterschied liegt mit $p=0,051$ an der Grenze zur Signifikanz und kann als Trend bezeichnet werden (Mann-Whitney-U Test).

Off-Season zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der γ/δ T-Zellpopulation in den Kontrollen (Median 52,95%) und der Gruppe der Allergiker ohne Immuntherapie (A-AIT; Median 79,4%).

Untergruppenvergleich

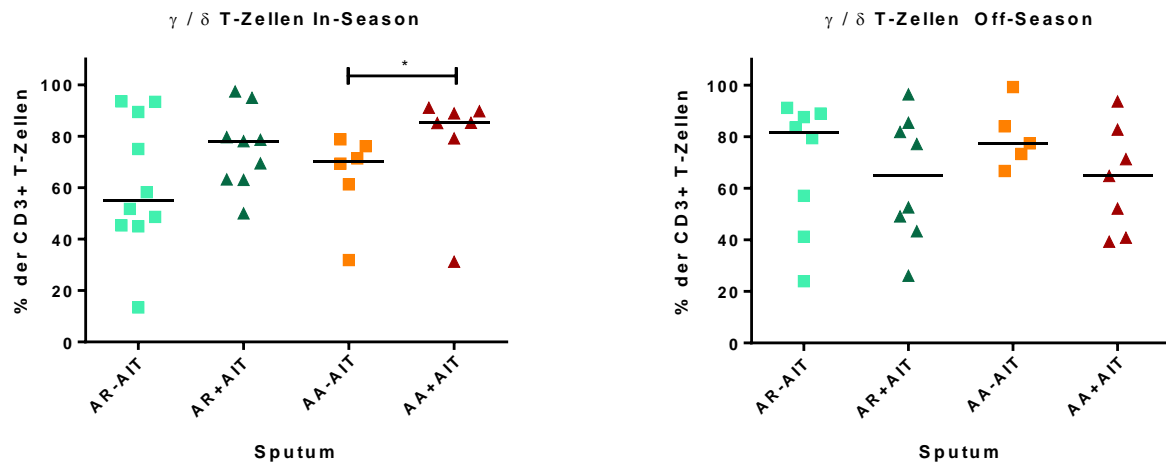


Abbildung 33: Untergruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

In-Season sieht man im Vergleich der Untergruppen, dass allergische Rhinitiker ohne Immuntherapie (AR-AIT) einen niedrigeren Median (55,0%) an γ/δ T-Zellen im Vergleich zu allergischen Rhinitikern mit Immuntherapie (AR+AIT, Median 78,1%) aufweisen. Das Ergebnis ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

In der Untergruppe der asthmatischen Probanden sieht man hingegen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der γ/δ T-Zellpopulation der allergischen Asthmatiker ohne Immuntherapie (AA-AIT; Median 70,4%) und der der allergischen Asthmatiker mit Immuntherapie (AA+AIT; Median 85,2%). Dieser Effekt ist nur in der Pollenflugsaison zu sehen.

Außerhalb der Pollenflugsaison sieht man zwischen den Untergruppen der Allergiker keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U Test, $p > 0,05$).

CD27+ γ/δ T-Zellen

Gruppenvergleich

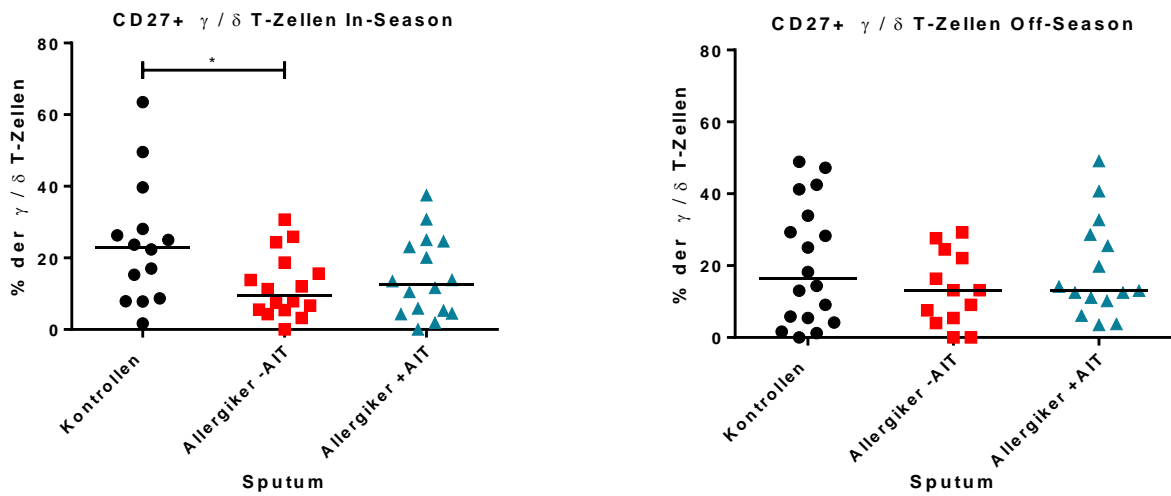


Abbildung 34: Gruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

In-Season finden sich in der Gruppe der gesunden Kontrollen bei einem Median von 23,1% ein signifikant höherer Anteil an CD27+ γ/δ T-Zellen als in der Gruppe der Allergiker ohne Immuntherapie mit einem Median von 9,6% (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Ein gleichgerichteter Unterschied ist als Trend auch zwischen Kontrollen und Allergiker mit Immuntherapie (Median 12,6%) zu sehen (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,103$).

Außerhalb der Allergiesaison zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$)

Untergruppenvergleich

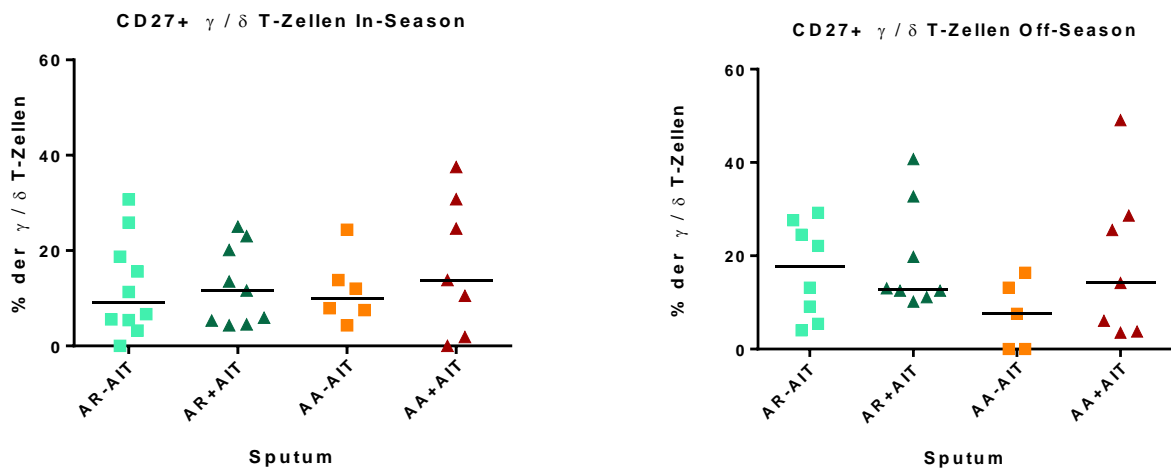


Abbildung 35: Untergruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Betrachtet man die Untergruppen, so finden sich innerhalb dieser keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-test, $p > 0,05$).

CD27- γ/δ T-Zellen

Gruppenvergleich

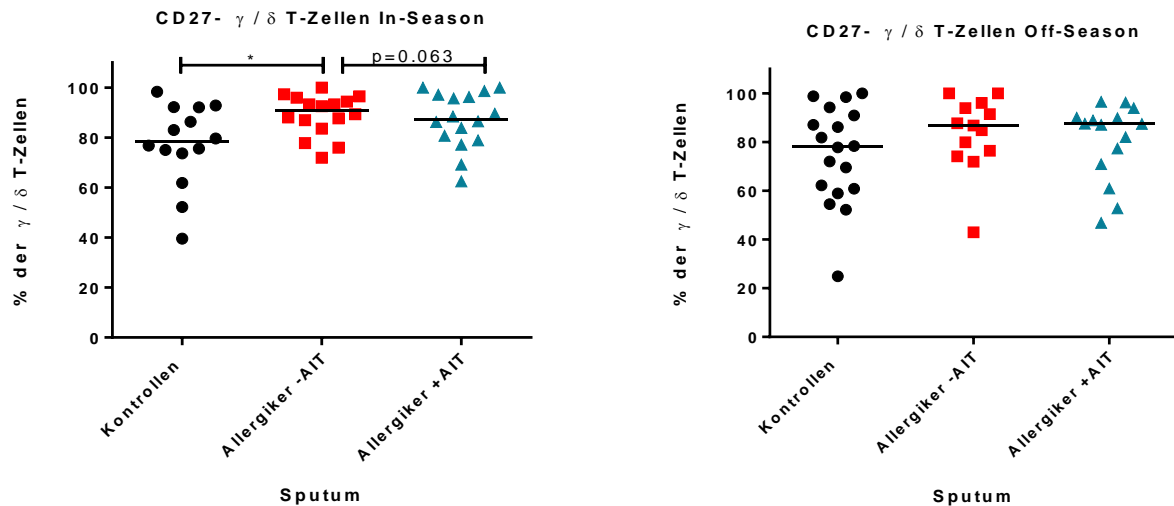


Abbildung 36: Gruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Betrachtet man in der Pollenflugsaison die relativen Anteile der CD27- γ/δ T-Zellen im Gruppenvergleich, fallen höhere Werte in den zwei Allergikerkohorten (Allergiker-AIT; Median 90,9%, Allergiker+AIT; Median 87,5 %) auf als in der Kontrollgruppe (Median 78,2%). In Kontrollen vs. Allergiker-AIT ist dieser Unterschied statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). In Kontrollen vs. Allergiker+AIT zeigt sich dieser Effekt nur als Trend ($p=0,063$).

Off-Season weisen die Gruppen keine Unterschiede von statistischer Signifikanz auf ($p > 0,05$). Die Mediane liegen bei 78,1% in der Kontrollgruppe, 86,8% in der Allergikerkohorte ohne Immuntherapie und 87,4% in der Allergikerkohorte mit Immuntherapie.

Untergruppenvergleich

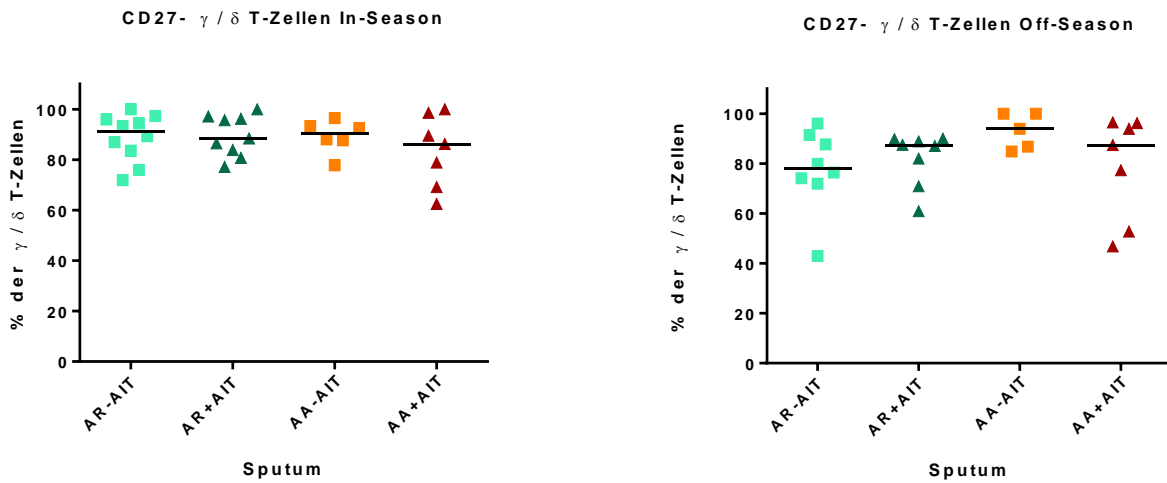


Abbildung 37: Untergruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

Der Untergruppenvergleich der CD27- γ/δ T-Zellen zeigt im Sputum weder In-Season noch Off-Season signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

4.4.2.1 NKT-like Zellen

Gruppenvergleich

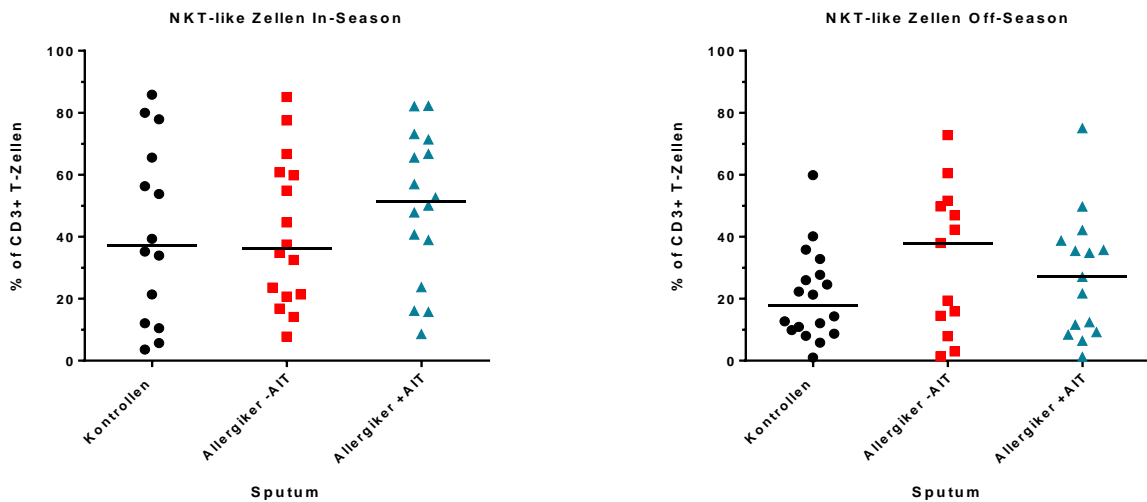


Abbildung 38: Gruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

In beiden Diagrammen wird die NKT-like Zellsubpopulation in und außerhalb der Pollenflugsaison dargestellt. Statistisch finden sich zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$). Auffallend ist eine starke Streuung der relativen Zellzahlen im Vergleich zu anderen untersuchten Subpopulationen.

Untergruppenvergleich

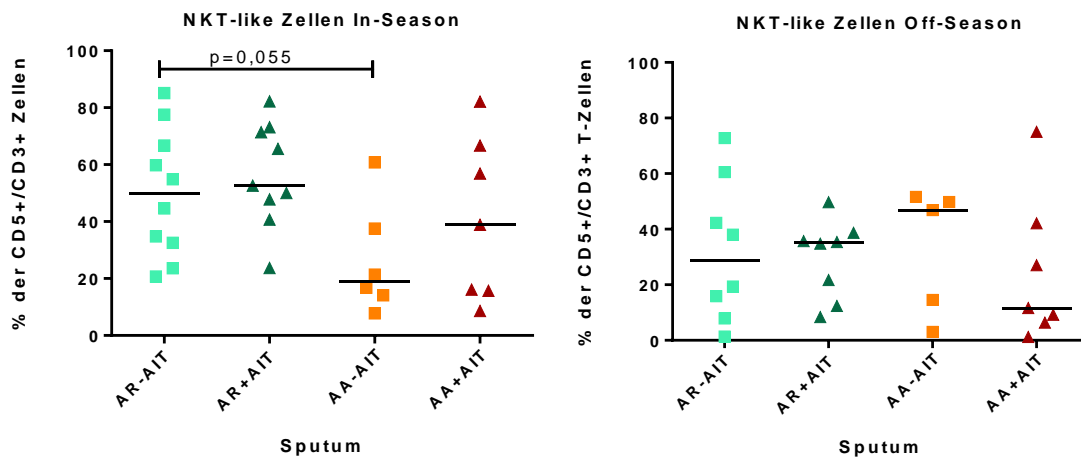


Abbildung 39: Untergruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, Sputum

In-Season weist die NKT-like Zellpopulation in den zwei Untergruppen ohne Immuntherapie (AR-AIT Median 49,8%; AA-AIT 19,1%) niedrigere relative Zellzahlen auf als die in der jeweils korrespondierenden Untergruppe mit Immuntherapie (AR+AIT Median 52,6%; AA+AIT Median 38,9%). Dieser Effekt ist allerdings nur als Trend zu bezeichnen, da die Unterschiede nicht statistisch signifikant sind (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$). Zwischen allergischen Rhinitikern und allergischen Asthmatikern ohne Immuntherapie zeigt sich ein knapp nicht signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,055$).

Off-Season zeigt die NKT-like Zellverteilung in den Untergruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

4.4.3 Korrelation von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen

Die Interaktion von regulatorischen T-Zellen und NKT-like Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (siehe Diskussion). Mit den vorliegenden Daten wurden daher die Zusammenhänge zwischen den beiden Zelltypen untersucht. Es erfolgte die Korrelation des relativen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen im Sputum und in den PBMCs (siehe Anhang).

4.4.3.1 Sputum

Alle Gruppen In- und Off-Season in Sputum

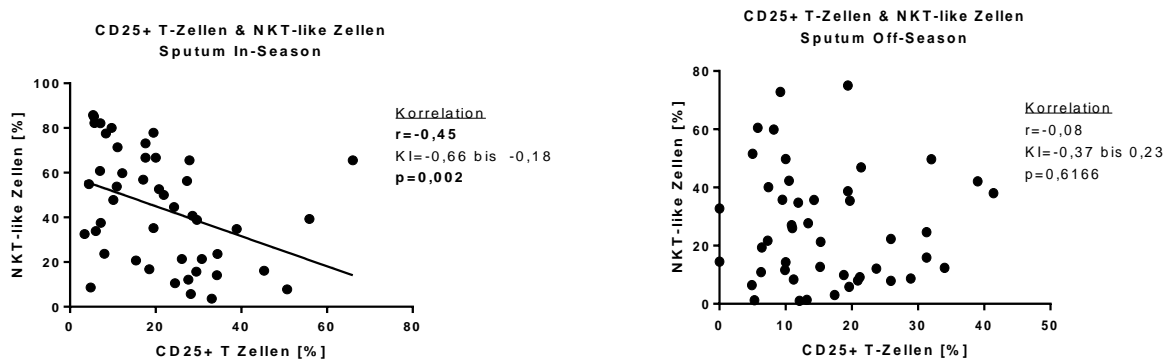


Abbildung 40: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; alle Probanden

Betrachtet man die prozentualen Zellzahlen in allen Gruppen, zeigt sich eine negative Korrelation zwischen aktivierten CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen in der Pollenflugsaison (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = -0,45$; $p < 0,01$).

Außerhalb der Pollenflugsaison zeigt sich keine Korrelation zwischen den Zellarten im Sputum ($p > 0,05$).

Gesunde In- und Off-Season im Sputum

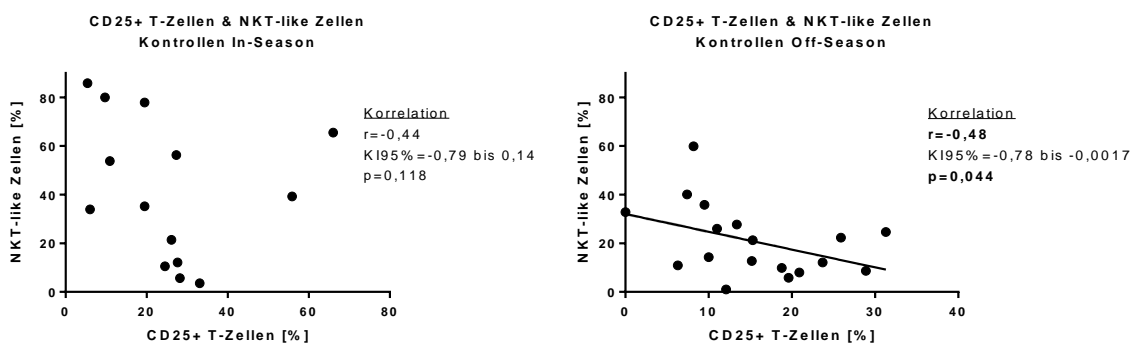


Abbildung 41: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; Kontrollen

Betrachtet man die Kontrollgruppe, so zeigt sich In-Season keine Korrelation zwischen den Zell-Subpopulationen ($p > 0,05$). Off-Season zeigt sich eine mittlere negative Korrelation zwischen CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = -0,48$; $p < 0,05$).

Effekt von Immuntherapie auf die Korrelation (AIT) im Sputum

Sputum - Allergiker ohne Immuntherapie

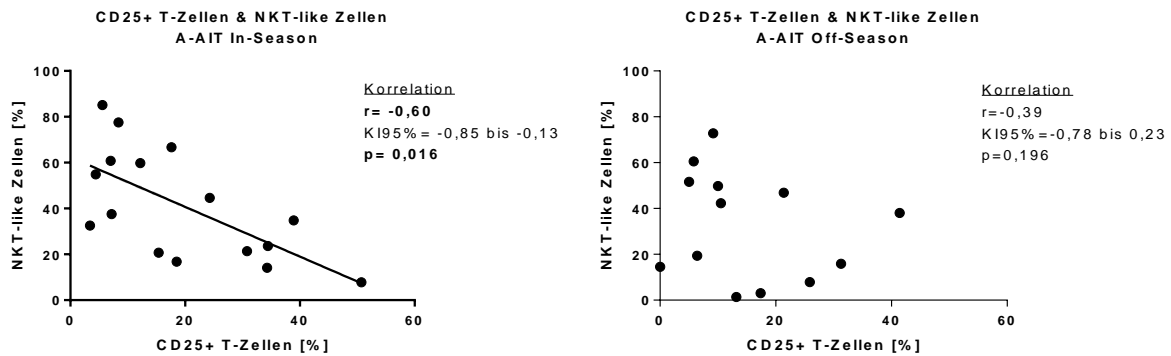


Abbildung 42: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; A-AIT

Allergiker ohne Immuntherapie zeigen einen starken negativen Zusammenhang von NKT-like Zellen und CD25+ T-Zellen. In-Season ist die statistische Signifikanz gegeben (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = -0,60$; $p < 0,05$). Off-Season ist das Ergebnis statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Sputum – Allergiker mit Immuntherapie

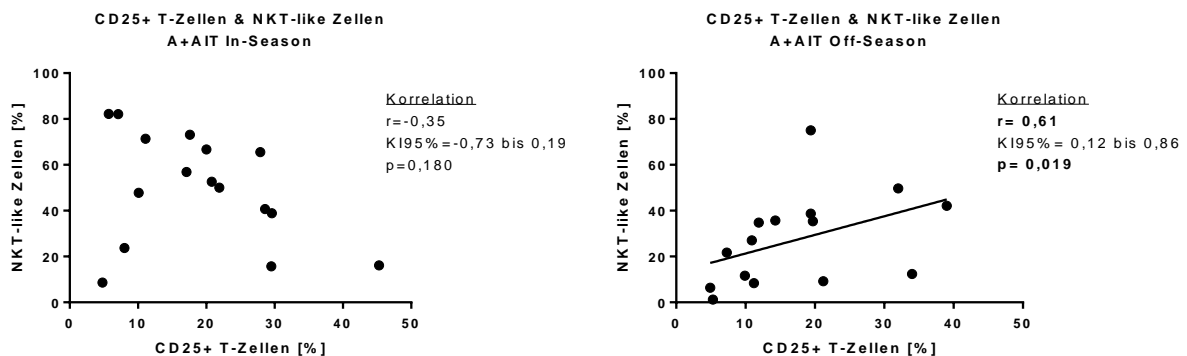


Abbildung 43: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; Sputum; A+AIT

Betrachtet man die Korrelation in der Gruppe der Allergiker mit Immuntherapie, zeigt sich In-Season ein ähnlicher, statistisch nicht signifikanter ($p = 0,180$), negativer Trend wie in der Gruppe ohne Immuntherapie. Interessanterweise zeigt sich Off-Season eine Umkehr der Verhältnisse hin zu einer signifikanten starken positiven Korrelation zwischen NKT-like Zellen und CD25+ T-Zellen (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,61$; $p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Häufig verwenden Studien zu allergischen Atemwegserkrankungen für die Gewinnung der sich in der Lunge befindlichen Zellen eine bronchoalveoläre Lavage (BAL). Hierbei handelt es sich um ein diagnostisch und therapeutisch nutzbares Verfahren, für welches die kleinen Atemwege gezielt mit Kochsalzlösung oder Ringerlösung gespült werden. Aus der Spülflüssigkeit heraus ist es möglich, Zellen zu isolieren und analog zu dem von uns genutzten Verfahren zu färben und mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Kontamination der Proben mit squamösen Zellen durch die Entnahmetechnik geringgehalten werden kann. Der große Nachteil der Methode ist jedoch die Invasivität, welche im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie mit ethischen Hürden verbunden ist. Die BAL erfolgt im Rahmen einer Bronchoskopie und hat eine Komplikationsrate von 2,3%, wobei am häufigsten Bronchospasmus und steriles Fieber auftreten (Totsch et al. 2007).

Die Sputuminduktion hat den großen Vorteil, nicht invasiv zu sein. Komplikationen, wie z. B. Bronchospasmus, können durch eine präventive Gabe von β 2-Sympathomimetika und einer niedrig konzentrierten Kochsalzlösung zur Inhalation vorgebeugt werden (Pizzichini et al. 2002). Nachteile des induzierten Sputums sind ein unter Umständen hoher Wert an squamösen Zellen und die Verunreinigung mittels Saliva und Speiseresten, zudem bedarf es eines hohen Zeitaufwandes durch gut geschultes Personal zur Durchführung des spezifizierten Protokolls. Durch ausgiebiges Spülen und Putzen der Nase vor der Expektoratation von Sputum kann der Anteil an squamösen Zellen jedoch reduziert werden. Die Probengewinnung für die vorliegende Studie erfolgte per **Sputuminduktion** nach dem Protokoll von U. Zissler (Zissler 2012).

Der Mittelwert der squamösen Zellen konnte in unserer Studie In-Season (8,82%) und der Off-Season (9,50%) jeweils unter 15% gehalten werden. Der Schwellenwert von 15% an squamösen Zellen an der Gesamtzellzahl gilt als Qualitätsmerkmal bei induziertem Sputum (Pedersen et al. 2019).

Insgesamt wiesen die in unsere Studie aus induziertem Sputum gefertigten Zytospins eine hohe Qualität auf und auch die durchflusszytometrischen Daten zeigen, dass

induziertes Sputum durchaus geeignet ist, um die Entzündungssituation in den unteren Atemwegen zu beurteilen.

Im Rahmen der Methoden ist auch die **Probandenakquise** zu erwähnen. Zu diskutieren ist hierbei vor allem ein Selektionsbias aufgrund einer jungen Probandenkohorte (Min. 20 Jahre, Max. 49 Jahre, Median 24 Jahre), ohne relevante anderwärtige internistische Vorerkrankungen (exklusive atopischer Erkrankungen).

Die Probanden wurden zum Teil aus dem Probandenpool der PACIFIC Studie, einer prospektiven Studie, welche seit 2012 protektive und inflammatorische Faktoren bei Aeroallergien und Mechanismen der spezifischen Immuntherapie untersucht, angeworben. Durch zusätzliche Rekrutierung freiwilliger Teilnehmer im privaten und universitären Umfeld hat sich dieser Selektionsbias hin zu einem jungen Probandenalter verstärkt. Die Geschlechterverteilung war mit 42,1% Männern und 57,9% Frauen nicht ausgeglichen. Eine festgelegte Alters- und Geschlechterverteilung wurde im Rahmen der Rekrutierung nicht vordefiniert. Hier hätte man im Vorfeld eine Altersverteilung der Probanden bei der Rekrutierung festlegen können, um ein breiteres Altersspektrum sowie einen ausgeglichenen Geschlechteranteil zu erreichen und so eine mögliche Verzerrung der Studienergebnisse zu minimieren.

Auch die ausschließliche Einbeziehung kontrollierter Asthmatiker könnte eine Beeinflussung der Ergebnisse bewirkt haben. Um die Allergiediagnostik nicht zu beeinflussen, wurde die Antihistaminikaeinnahme sieben Tage vor Induktion abgesetzt. Jedoch erfolgte im Rahmen der Studienteilnahme aus gesundheitlichen Gründen keine Pausierung der antiasthmatischen Therapie. Diesbezüglich ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Tatsache, dass vor allem ICS eine hemmende Wirkung auf Entzündungszellen haben, die Ergebnisse verfälscht haben könnte (siehe Diskussion: Eosinophile).

Auch polyvalente Allergiker sind ein möglicher Schwachpunkt unserer Kohorte. Diese Patientengruppe wurde nicht per se von der Studie ausgeschlossen, wenn keine regelmäßige Exposition gegenüber dem Allergen bestand. Die Exposition gegenüber möglichen perennialen Allergenen wie Tierhaarepithelien und Hausstaubmilbenkot ist jedoch nur schwer zu objektivieren und kontrollieren (s. u.).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Klinische Daten

Mittels Spirometrie wurden das forcierte Einsekundenvolumen (FEV1) und die forcierte Vitalkapazität (FVC) bestimmt und daraus der Tiffeneau-Index errechnet [FEV1/FVC]. Ab einem Tiffeneau-Index von $<70\%$ muss eine Atemwegsobstruktion in Betracht gezogen werden, jedoch ist dieser Parameter abhängig von Körpergröße und Alter (Roberts et al. 2006). In den Ergebnissen der Spirometrie bestanden zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Allergiker +/- Immuntherapie keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$). Bedingt durch die durchwegs gute Einstellung und Kontrolle des individuellen Asthmas konnten wir in unserer Kohorte keine signifikanten Unterschiede bei den spirometrischen Parametern zwischen den gesunden Kontrollprobanden und der Gruppe der Allergiker zeigen. Eine Sputuminduktion bei einer FEV1% $<70\%$ galt als Kontraindikation. Dies war der Patientensicherheit geschuldet, da Patienten mit unkontrolliertem Asthma ein höheres Risiko für eine Verschlechterung ihres FEV1 im Sinne eines Bronchospasmus während oder nach der Induktion haben. Die Studiengruppe um de la Fuente hat gezeigt, dass die Sputum Induktion bei Probanden mit schwerem Asthma in 11,6% der Fälle abgebrochen werden musste und der FEV1-Abfall im Vergleich zu Patienten mit mildem Asthma signifikant höher war (de la Fuente et al. 1998). Eine Induktion ist bei Patienten mit schwerem oder unkontrolliertem Asthma grundsätzlich möglich, bedarf allerdings einer engmaschigen Kontrolle des FEV1. Daher wurde in dieser Studie auf die Untersuchung dieser Patientengruppe verzichtet.

Bezüglich der oben genannten Thematik ist weiters anzumerken, dass die Frage, ob das induzierte Sputum unter kontrollierten Umständen das Entzündungsgeschehen in der Lunge in vollem Ausmaß der Erkrankung widerspiegeln kann, strittig ist. Untersuchungen des SARP (Severe Asthma Research Programm) haben fünf klinische Asthmatypen identifiziert, denen vier verschiedene Entzündungsprofile im induzierten Sputum zugewiesen werden konnten (Moore et al. 2014). Die besagte Studie legt nahe, dass wir durch die Einschränkung auf kontrollierte Asthmatiker eine gewisse Vorauswahl in Bezug auf das Inflammationsgeschehen getroffen haben. Für künftige Studien wäre es interessant, die Zellpopulationen dieser Arbeit auch im Sputum von Patienten mit nicht kontrolliertem Asthma zu untersuchen.

Die **Sputumzellzahl pro ml** Sputum ist ein Maß für die Inflammation der unteren Atemwege. Als Korrelat zur inflammatorischen Reaktion von Allergikern während der Pollenflugsaison zeigen sich in den Gruppen der Allergiker In-Season höhere Zellzahlen als Off-Season. Diese Unterschiede sind nur als Trend zu verzeichnen (A-AIT i.s. vs. o.s., $p=0,067$; A+AIT i.s. vs. o.s., $p=0,541$). Hierbei ist zu beachten, dass sich das Sputum aus verschiedenen Zellarten zusammensetzt und die Hauptakteure der allergischen Entzündung – eosinophile Granulozyten und Lymphozyten - nur einen geringen Anteil an der Gesamtzellzahl ausmachen. Die Normwerte bei Erwachsenen für Lymphozyten und eosinophile Granulozyten liegen bei $< 3\%$, beziehungsweise $< 2\%$ (siehe Tabelle 13) (Zissler 2012).

Eine zentrale Rolle bei der Diagnose einer allergischen Entzündung spielen **eosinophile Granulozyten**. Von einer Eosinophilie spricht man ab einem Wert von 450-550 eosinophilen Granulozyten pro μl Blut (Kovalszki and Weller 2016). In unserer Studie wurden eosinophile Granulozyten nur im Sputum bestimmt. Für künftige Studien sollte diese Zellreihe auch im Blut untersucht werden, um so die Eosinophilie systemisch und lokal bewerten zu können.

Mit Hilfe unserer Zytospins konnten wir nachweisen, dass Allergiker eine signifikant höhere Anzahl an Eosinophilen in ihrem Sputum aufweisen als die Kontrollgruppe. Dies entspricht dem allgemeinen wissenschaftlichen Konsens. Der Normwert für eosinophile Granulozyten im Sputum liegt bei $< 2\%$ (siehe Tabelle 13) (Zissler 2012). Interessanterweise konnten wir bei den Allergikern keine signifikanten Unterschiede zwischen In-Season und Off-Season nachweisen. Der Median war In-Season niedriger als Off-Season (Median 0,00% vs. Median 0,13%). Dieses Ergebnis widerspricht unseren Erwartungen. Für dieses Ergebnis gibt es im Folgenden erläuterte Erklärungen. Durch die Medikation in der Allergiesaison werden die eosinophilen Granulozyten gehemmt. Es sind unterschiedliche Effekte der Allergiemedikation bekannt. Inhalative und systemische Glucocorticoide induzieren direkt die Apoptose von eosinophilen Granulozyten und hemmen Überlebenssignale, die durch Zytokine wie IL-5 (eosinophil colony stimulating factor), IL-3 oder GM-CSF generiert werden (Meagher et al. 1996; Robinson et al. 1993; Culpepper and Lee 1985). Ein weiterer Effekt von Glucocorticoiden ist die Hemmung der Einwanderung von Eosinophilen durch Downregulation von Adhäsionsmolekülen (VCAM1/ICAM1/E-Selectin) (Zielinska et al. 2016; Sakae et al. 2014).

H1-Antihistaminika der zweiten Generation (z. B. Levoceterizin und Desloratadin) hemmen ebenfalls die Einwanderung von Eosinophilen über die Downregulation von Adhäsionsmolekülen VCAM1 und ICAM1 (Wu, Mitchell, and Walsh 2005; Vignola et al. 1995). In vitro beschrieben Sedgwick et al. auch eine verminderte IL-5-unterstützte Überlebensdauer der eosinophilen Granulozyten unter Ceterizin (Sedgwick and Busse 1997). IL-5 wird auch als „eosinophil colony stimulating factor“ bezeichnet und spielt eine zentrale Rolle im Wachstum und der Differenzierung von eosinophilen Granulozyten (Altmeyer 2017).

Die siebentägige Antihistaminika Karenz vor der Induktion ist möglicherweise nicht ausreichend, um das Bild der Eosinophilie im Sputum zu „normalisieren“. Dieser mögliche Effekt und das Einschlusskriterium „kontrolliertes Asthma“ sowie die damit verbundene Therapie mit u. a. inhalativen Corticosteroiden erklären einen verminderten Anteil an eosinophilen Granulozyten In-Season.

Dass die Eosinophilenanzahl Off-Season nicht abfällt, lässt die Vermutung zu, dass die allergische Entzündung auch außerhalb der Pollenflugsaison persistiert. Diese These unterstützt die schwach positive Korrelation von eosinophilen Granulozyten mit dem MiniRQLQ Off-Season. Somit haben Probanden mit höheren Werten an Eosinophilen auch außerhalb der Gräserpollenzeit eine eingeschränkte Lebensqualität. Ein Erklärungsansatz ist das Bestehen multipler Allergien, zum Beispiel gegen Hausstaubmilben oder Tierepithelien. Das Bestehen zusätzlicher Allergien wurde mittels Pricktest ermittelt und war, sofern keine Dauorexposition bestand, kein Ausschlusskriterium für die Studienteilnahme. Diese Tatsache ist eine Schwäche unserer Studie, da eine Dauorexposition bei Hausstaubmilben schwer zu objektivieren ist und wir auf die Aussagen unserer Probanden angewiesen waren, beispielsweise in Bezug auf den Tierkontakt (s. o.).

Für weitere Studien könnte man in Betracht ziehen, die Gruppe der Allergiker restriktiver zu wählen. Die Prävalenz für eine Gräserpollen-Sensibilisierung liegt für Frauen bei 16,5% und für Männer bei 21% (Mittelwert errechnet aus Daten für 18- bis 79-Jährige (Klimek, Vogelberg, and Werfel 2019c)). Es stellt sich das Problem, dass strikt univalente Allergien auf Gräserpollen nicht die Regel sind. Die Prävalenz multipler Sensibilisierung für verschiedenen Antigene ist ein häufiges Phänomen: Laut einer Studie von Ciprandi et al. weisen 75% aller Allergiker eine Sensibilisierung für

mehr als ein Allergen auf (Ciprandi and Cirillo 2011). Dieser Umstand erschwert die Akquirierung von Probanden, welche eine isolierte Gräserpollenallergie aufweisen.

Der **Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire** wurde als Test zur Objektivierung der Einschränkung der Lebensqualität durch allergische Rhinitis durchgeführt. Die deutlich höhere Lebensqualitätseinbuße, die In-Season bei den Allergikern mittels des MiniRQLQs gemessen wurde, relativiert die oben postulierte Schwäche unserer Studie. Es zeigt sich eine deutliche Belastung der allergischen Probanden während des Gräserpollenfluges im Vergleich zur Off-Season ($p < 0,0001$). Dieses Ergebnis kann als Qualitätsnachweis für die von uns ausgewählten Zeiträume In- und Off-Season sowie die selektive Auswahl der Allergiker interpretiert werden. Eine Studie von Gargano et al., in welcher für *Tetranychus urticae* (gemeine Spinnmilbe) und *Dermatophagoides pteronyssinus* (Hausstaubmilben) sensibilisierte Probanden in eine asymptomatische und eine symptomatische Probandengruppe unterteilt wurden, zeigen, dass die symptomatische Gruppe signifikant höhere Level an spezifischen IgE aufwies als die asymptomatische Gruppe ($p < 0,05$) (Gargano et al. 2002). In unserer Arbeit konnte ein schwach positiver Zusammenhang zwischen dem MiniRQLQ und den im Blut gemessenen, spezifischen IgE-Leveln gezeigt werden, dieser zeigte sich jedoch nicht signifikant ($r=0,24$; $p > 0,05$). Dieser schwach ausgeprägte und nicht signifikante statistische Zusammenhang beruht vermutlich auf Bodeneffekten und nicht normalverteilten Daten.

In der **Durchflusszytometrie** wurden je 1×10^6 Zellen in den PBMCs und je $0,5 \times 10^6$ Zellen im Sputum aufgenommen. Im Sputum betrug der Anteil an lebenden Zellen In-Season $74,8\% \pm 15,1\%$ und Off-Season $71,1\% \pm 13,7\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). In den PBMCs betrug der Anteil an lebenden Zellen IN-Season $99,5\% \pm 0,6\%$ und Off-Season $99,9\% \pm 0,1\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Hier zeigt sich, dass ein hoher Prozentsatz an lebenden Zellen aus induziertem Sputum gewonnen werden konnte. Dies ist eine Grundlage für die Qualität weiterführender Experimente. Die Leukozyten machten $97,8\% \pm 0,2\%$ in den PBMCs und $20,0\% \pm 1,8\%$ im Sputum aus. Diese sich stark unterscheidenden Prozentsätze lassen sich durch die Aufbereitung der Blutproben erklären. Durch die in 3.6 beschriebene Aufbereitung erhält man aus dem Blut nur die PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes), welche sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammensetzen. Im Sputum wurde keine vergleichbare Vorselektion der Zellen vorgenommen.

Die Durchflusszytometriedaten zeigen eine geringere Frequenz an Leukozyten im Sputum als in den PBMCs. Eine Lösung für dieses Ungleichgewicht ist das Rechnen mit relativen Zahlen, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Ein alternativer Ansatz wäre die Erhöhung der Anzahl der aufgenommenen Zellen im Sputum bei der Durchflusszytometrie. Allerdings zeigte sich bei Durchführung der Studie, dass in beiden Untersuchungszeiträumen 19 von insgesamt 112 Probanden weniger als $0,5 \times 10^6$ Zellen in ihrem Sputum hatten. Wenn man die Grenze auf über $1,0 \times 10^6$ Zellen anheben würde, müssten in unserem Fall 15 weitere Probanden von der durchflusszytometrischen Untersuchung ausgeschlossen werden. Da Sputum ein bezüglich der induzierbaren Menge begrenztes Gut ist, kann die Anzahl der daraus gewonnenen Zellen, im Vergleich zu den PBMCs (Abnahme eines zweiten CPT™-Tubes), nicht beliebig angehoben werden. Möglich wäre eine erneute Induktion an einem anderen Tag. Allerdings ist die Qualität der „Momentaufnahme“ beim Zusammenführen von an unterschiedlichen Tagen gesammelten Daten nicht mehr gegeben. Zusätzlich ist eine reiz-induzierte Erhöhung einzelner Leukozytenpopulationen bei fehlendem Mindestabstand von fünf bis sieben Tagen zwischen den Induktionen nicht auszuschließen. Aus diesen Gründen haben wir uns in unserer Studie gegen eine solche Vorgehensweise entschieden.

In der folgenden Diskussion werden die mittels Durchflusszytometrie untersuchten T-Zell-Subpopulationen genauer betrachtet und die Ergebnisse kritisch beleuchtet.

Die T-Zell-Subpopulationen wurden aus den CD5+/CD3+ T-Zellen heraus bestimmt.

Für die **CD5+/CD3+ T-Zellen** wurde die Gatesetzung bewusst sehr strikt gewählt, um vor allem im Sputum falsch positive Events auszuschließen. Aus diesem Grund wurde zuerst das CD5+ Gate gesetzt, da hier die Zellpopulation besser abzugrenzen war und erst anschließend die CD3+ T-Zellen daraus bestimmt. Die CD5+/CD3+ T-Zellen wurden in den PBMCs und im Sputum aller Probanden bestimmt. Ihr Anteil an der Leukozytenpopulation wurde errechnet. In den PBMCs zeigt sich ein Anteil an CD5+/CD3+ T-Zellen mit einem Mittelwert über alle Probanden und beide Seasons von $65,82\% \pm 1,27\%$ (siehe Tabelle 14). In der Literatur wird die Frequenz von CD3+ T-Zellen im Blut mit einem Anteil von 58-70% der Lymphozyten angegeben (Kleiveland 2015). Somit liegt der von uns gemessene Anteil im erwarteten Prozentbereich.

Im Sputum lagen Mittelwert \pm SEM der T Lymphozyten Population bei $3,59\% \pm 0,25\%$ der Leukozyten. Dieser Wert entspricht der Größenordnung für Sputum, der in Tabelle 13 dargestellt ist (Zissler 2012).

Die Verteilung der T-Zellen in den einzelnen Gruppen und Seasons ist sehr allgemein und noch wenig aussagekräftig, da hier alle T-Zell-Subpopulationen enthalten sind. Darum werden diese im Folgenden einzeln betrachtet.

Der Oberflächenmarker CD25 ist der hochaffine Teil des Interleukin-2 Rezeptors (α -Kette) und findet sich auf aktivierten T-Zellen und auf regulatorischen T-Zellen, für welche CD25 ein konstitutiver Marker ist (Murphy and Weaver 2018e). Allerdings ist dieser Marker für die Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen alleine nicht ausreichend. Laut des wissenschaftlichen Konsenses, welcher am „CIMT immunoguiding program (CIP) regulatory T cell workshop 2013“ getroffen wurde, braucht es zur Charakterisierung von rein regulatorischen T-Zellen mindestens folgende Marker: CD3, CD4, CD25, CD127, und FoxP3 (Santegoets et al. 2015).

Zum Zeitpunkt der Versuchsreihe war eine intrazelluläre Färbung von Sputumzellen mit Foxp3 von uns noch nicht ausreichend etabliert worden. Wir haben im Rahmen unseres Antikörperpanels von den oben angegebenen Markern nur CD3 und CD25 gefärbt. Somit lassen sich **CD25+ T-Zellen** in der Durchflusszytometrie quantifizieren, welche aktivierte T-Zellen und regulatorische T-Zellen implizieren (Murphy and Weaver 2018e). Die Ergebnisse zeigen einen Anteil von $18,6\% \pm 1,3\%$ (Mittelwert \pm SEM, Tabelle 14) an CD25+ T-Zellen und sind daher ermutigend für die weitere Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen aus Sputum. Die Studiengruppe um Kinoshita hat bereits 2013 regulatorische T-Zellen mittels intrazellulärer Foxp3 Färbung aus induziertem Sputum untersucht (Kinoshita et al. 2014). In dieser Studie wurden allerdings, aus den von Santegoets et al. definierten Markern, nur CD3+, CD4+ und Foxp3 bestimmt. Für weitere Studien wäre es von großem Interesse, Sputumzellen mit allen oben gegebenen Markern zu charakterisieren und so die Rolle von regulatorischen T-Zellen im Sputum näher zu untersuchen.

In den von uns erhobenen Daten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der CD25+ T-Zellpopulation zwischen den Gruppen und Untergruppen gezeigt werden. Allerdings ergab sich eine Umkehr des relativen Verhältnisses zwischen

allgemeinen T-Zellen und der speziellen Subpopulation der CD25+ T-Zellen. Während CD3+CD5+ T-Zellen einen weitaus höheren Anteil an den PBMCs ($65,8\% \pm 1,3\%$) haben als im Sputum ($3,6\% \pm 0,3\%$), zeigt sich für die CD25+ T-Zellen ein umgekehrtes Bild. In den PBMCs fand sich ein Mittelwert von $1,9\% \pm 0,01\%$ - im Vergleich zu $18,6\% \pm 1,3\%$ im Sputum (siehe Tabelle 14). Dies stützt die These eines stattfindenden Pooling von T-Zellen in der Lunge. Dies ist einer von vielen Hinweisen darauf, dass Sputum als „Schnappschuss“ der aktuellen immunologischen Situation der Lunge fungiert.

Allergische Erkrankungen treten bei einer gestörten Bildung von Toleranz gegenüber spezifischen Antigenen auf. Regulatorische T-Zellen spielen hierbei eine wichtige Rolle. Unter anderem modulieren sie durch ihre IL-10-Produktion TH2 Zellen und dendritische Zellen und hemmen so die proallergische Zellantwort (Hawrylowicz 2005).

Die Pathomechanismen, die zu einer fehlenden bzw. reduzierten Regulation und somit zur Allergie führen sind vielfältig. Studien wie die von Agnès Hamzaoui et al. zeigen eine verminderte Anzahl von CD4+/CD25+ regulatorischen T-Zellen in induziertem Sputum von asthmatischen Kindern (Hamzaoui, Ammar, and Hamzaoui 2010). Diesen Effekt konnten wir in den CD25+ T-Zellen als Trend beobachten. In-Season lag der Median bei den Kontrollen mit 25,3% höher als bei den Allergikern ohne Immuntherapie mit 16,5% und den Allergikern mit Immuntherapie mit 18,8%. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen ist allerdings statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0.05$).

Andere Studien wiederum postulieren eine Fehlfunktion der regulatorischen T-Zellen und eine Imbalance zwischen regulatorischen und TH2 Zellen in allergischen Probanden (Ling et al. 2004; Akdis et al. 2004). So konnten Ling et al. zeigen, dass die regulatorische Funktion von CD4+/CD25+ Zellen bei atopischen und allergischen Probanden im Vergleich zu regulatorischen Zellen von gesunden Probanden in vitro signifikant verringert waren. Gemessen wurde die Proliferationsrate von regulatorischen CD4+/CD25+ T-Zellen sowie die IL-5 Produktion und Proliferationsrate von CD4+/CD25- T-Zellen (Ling et al. 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass regulatorische T-Zellen sowohl durch ihre numerische Verringerung als auch durch die gestörte Funktion und die Interaktion mit anderen Zellen in der Genese und Erhaltung von allergischen Erkrankungen eine Rolle

spielen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD25⁺ T-Zellen in ausreichendem Anteil im Sputum zu finden sind, und ihr prozentualer Anteil im Sputum höher ist als im Blut. Für die genauere Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen und deren Funktionen bedarf es in folgenden Studien weiterer funktioneller Untersuchungen z. B. in Zellkultur und eines erweiterten Färbepanels.

Gewebe, die unmittelbar mit der Umwelt in Berührung kommen, sind die Heimat der **γ/δ T-Zellen**. In Darm, Haut, Uterus/Vagina und Lunge sind γ/δ T-Zellen angereichert, sie werden auch als gewebeständige Lymphozyten bezeichnet. (Carding and Egan 2002; Christmas et al. 1993)

Der γ/δ T-Zellrezeptor ist für die Identifizierung und Funktion der Zelle unerlässlich. Durch die Immunglobulin ähnliche Konfiguration des Rezeptors ist es den γ/δ T-Zellen möglich, Antigene direkt zu erkennen (Allison et al. 2001; Carding and Egan 2002). Aufgrund der Fähigkeit von γ/δ T-Zellen, zum einen Antigene ohne MHC-Präsentation zu erkennen und zum anderen TH1-, TH2- und TH17-Mediatoren zu produzieren, wird ihnen eine Brückenbildung zwischen innatem und adaptivem Immunsystem zugeschrieben (Mangan et al. 2013; Murphy and Weaver 2018b).

In dieser Arbeit wurden in der Durchflusszytometrie die γ/δ T-Zellpopulation aus der CD3⁺ T-Zellpopulation heraus bestimmt. Die γ/δ T-Zellpopulation wurde bewusst nicht aus den CD5⁺/CD3⁺ T-Zellen abgeleitet, da in der Literatur, sowohl CD5⁺ als auch CD5⁻ γ/δ T-Zellen beschrieben worden sind (Lefrancois 1991; Cron et al. 1989).

Der Vergleich der relativen γ/δ T-Zellzahlen in PBMCs und Sputum zeigte große Unterschiede zwischen den beiden Matrices: In den PBMCs zeigte sich ein Mittelwert und SEM von 0,9% \pm 0,1%, im Sputum lagen Mittelwert und SEM bei 65,6% \pm 2,3% (siehe Tabelle 14). Die von uns gemessenen Werte decken sich mit denen der aktuellen Literatur. Laut Kabelitz et al. beläuft sich der γ/δ T-Zellanteil an der CD3⁺ T-Zellpopulation im Blut auf 1-10% (Kabelitz, Wesch, and Hinz 1999). Richtwerte für die γ/δ T-Zellzahl im Sputum sind noch nicht etabliert. In der Arbeit von Raulf et al. wurde der Anteil an CD3⁺ γ/δ ⁺ T-Zellen an den Leukozyten in der BAL für verschiedene Atemwegserkrankungen untersucht. Die dort angeführten Prozentzahlen entsprechen in ihrer Größenordnung unseren Ergebnissen. Hierfür müssen die Daten rückgerechnet werden, um den Anteil an den Leukozyten abzubilden (Daten hier nicht

gezeigt) (Raulf et al. 1994). Die Frequenz in Schleimhäuten und Epithelien wird mit bis zu 50% angegeben (Kabelitz, Wesch, and Hinz 1999).

Die spezifische Anreicherung von γ/δ T-Zellen in immunologischen Grenzflächen impliziert ihre potenzielle Beteiligung an wichtigen immunologischen Prozessen in chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen (Urboniene et al. 2013).

Pawankar et al. konnten in Untersuchungen von perennialen allergischen Rhinitikern mit Hausstaubmilbenallergie einen in der nasalen Mucosa höheren Anteil und eine vermehrte Aktivierung von γ/δ T-Zellen mit TH2-Zytokinprofil im Vergleich zum Blut nachweisen (Pawankar et al. 1996).

Seit der Entdeckung des γ/δ T-Zellrezeptors 1986 (Brenner et al. 1986; Bank et al. 1986) sind eine Reihe an Liganden, die zur Aktivierung der humanen γ/δ T-Zelle führen identifiziert worden. Diese spiegeln ihre komplexen Funktionen wieder.

Die γ/δ T-Zellen nehmen eine wichtige Stellung in der Bekämpfung bakterieller Infektionen ein. Die genauen Mechanismen ihrer Aktivierung sind jedoch noch nicht vollständig erforscht. Allerdings sind bereits verschiedene Liganden aus der Gruppe der Phosphoantigene identifiziert worden. Die Studiengruppe um Eberl konnte zeigen, dass γ/δ T-Zellen durch bestimmte phosphorylierte Metabolite, wie zum Beispiel das mikrobielle HMB-PP, aktiviert werden (Eberl et al. 2003). Auch eine Aktivierung durch die Erkennung von PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) über den Toll-like-Rezeptor wurde diskutiert (Pietschmann et al. 2009).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass γ/δ T-Zellen Endothelprotein-C-Rezeptoren auf der Oberfläche von epithelialen Tumorzellen und durch Zytomegalievirus infizierten Zellen erkennen (Willcox et al. 2012). Sowohl in soliden als auch in hämatologischen Tumormodellen konnten zytotoxische Eigenschaften der γ/δ T-Zellen nachgewiesen werden. Das zytotoxische Potential von γ/δ T-Zellen ist Inhalt aktueller Forschung, besonders in Bezug auf die adaptive T-Zellimmuntherapie. (Kabelitz et al. 2004; Wrobel et al. 2007; Kabelitz 2016; Siegers et al. 2011)

Eine für die vorliegende Arbeit relevante Entdeckung machte 2006 die Arbeitsgruppe um A. Russano. Erstmals wurde gezeigt, dass γ/δ T-Zellen aus allergischen Individuen Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) aus Zypressen- und Olivenpollen CD1d-abhängig erkennen können. Nach Kontakt mit dem Pollen-PE proliferierten die γ/δ T-Zellen

allergischer Probanden und produzierten sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine. Als Folge konnte eine erhöhte IgE-Produktion nach PE-Kontakt gemessen werden. Dieser neu entdeckte Mechanismus der frühen Immunantwort gegen Pollen konnte nur in allergischen Probanden gezeigt werden. (Russano et al. 2006) Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass γ/δ T-Zellen einen direkten Einfluss auf das allergische Geschehen nehmen, indem sie Pollen als Antigene wahrnehmen.

Zusammenfassend sind γ/δ T-Zellen in der Lage, verschiedene Pathogene zu erkennen und sowohl direkt durch Zytotoxizität, als auch indirekt durch die Aktivierung von innaten und adaptiven Immunsystem darauf zu reagieren (Zheng et al. 2013).

Sade et al. untersuchten den Effekt von allergenspezifischer Immuntherapie (AIT) auf das T-Zellrezeptor Repertoire im Blut und konnten keinen signifikanten Effekt der AIT auf die Anzahl an γ/δ T-Zellen finden (Sade et al. 2003). Unsere Untersuchung der γ/δ T-Zellen in den PBMCs stützt dieses Ergebnis. So konnten wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in den PBMCs feststellen (siehe Anhang). Im Gegensatz dazu konnten wir im Sputum sehr wohl Unterschiede im Gruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellanteile In- und Off-Season zeigen (Kontrollen, Allergiker-AIT und Allergiker+AIT).

In-Season zeigte sich im Sputum, dass in Probanden mit Immuntherapie mehr γ/δ T-Zellen zu finden sind als in Probanden ohne Immuntherapie (A-AIT Median 65,3%, und A+AIT 79,4%). Der Unterschied zeigt sich als Trend an der Grenze zur Signifikanz ($p=0,051$). Passend zu diesem Ergebnis konnten wir im Untergruppenvergleich in den asthmatischen Probanden mit Immuntherapie (AA+AIT; Median 85,2%) statistisch signifikant mehr γ/δ T-Zellen nachweisen als in den Asthmatikern ohne Immuntherapie (AA-AIT; Median 70,4%). Unsere Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass durch die AIT eine Polarisierung und Proliferation der γ/δ T-Zellen mit antiinflammatorischem Effekt entsteht.

Um den genauen Wirkmechanismus der AIT auf die Anzahl und Funktion der γ/δ T-Zellen zu verstehen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

In Mäusen mit kollageninduzierter Arthritis konnten Petermann et al. zeigen, dass γ/δ T-Zellen in der Entstehung der Erkrankung eine proinflammatorische Funktion besitzen. Allerdings zeigte sich bei etablierter Erkrankung eine regulatorische Funktion der γ/δ T-Zellen. Erfolgte die Depletion von γ/δ T-Zellen zu Beginn der Erkrankung,

war der Verlauf milde, erfolgte die Depletion nach 40 Tagen, so kam es zu einer Exazerbation der Arthritis (Peterman et al. 1993).

Ein ähnlicher Mechanismus ist auch in allergischen Atemwegserkrankungen und konsekutiv durchgeführten AIT denkbar, da γ/δ T-Zellen in Allergien eine duale Rolle zugeschrieben wird.

Vor dem Hintergrund allergischer Erkrankungen wurden γ/δ T-Zellen sowohl im proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Kontext beschrieben (Pawankar 2000). In verschiedenen Studien wurden im Sputum sowie BAL asthmatischer Probanden mehr γ/δ T-Zellen gemessen als bei gesunden Probanden. Im Sputum asthmatischer Probanden konnte im Vergleich zu gesunden Probanden ein TH2-Zytokinprofil der γ/δ T-Zellen gezeigt werden (Hamzaoui et al. 2002; Spinozzi et al. 1996). Im Gegensatz dazu konnte die Studiengruppe um Urboniene et al. im Sputum keinen signifikanten Unterschied zwischen Asthmatikern und gesunden Probanden feststellen (Urboniene et al. 2013). Zusätzlich wurde gezeigt, dass γ/δ T-Zellen eine suppressive Funktion in der allergischen TH2-Antwort ausüben können (Lahn et al. 1999; Murdoch, Gregory, and Lloyd 2014).

Die genaue Rolle von γ/δ Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen bedarf weiterer Untersuchungen. Humane γ/δ T-Zellen können nach ihrer δ Kette in V δ 1- und V δ 2-Subpopulation unterteilt werden (Pang et al. 2012; Wu et al. 2014). Da in unserer Versuchsreihe der γ/δ TCR gefärbt wurde, können wir über diese Untergruppen keine Aussage treffen. Für weitere Studien wäre es interessant, im Sputum auch die V δ 1 und V δ 2 Subpopulationen zu bestimmen um so spezifischere Aussagen über die Verteilung treffen zu können. In unserer Studie wurde der Oberflächenmarker CD27 für die weitere phänotypische und funktionelle Unterteilung der γ/δ Zellen herangezogen (s. u.).

Die Beurteilung unserer Ergebnisse zeigt sich durch die Tatsache limitiert, dass es keine Normwerte für den Anteil an γ/δ T-Zellen im Sputum gibt. Die meisten Studien über γ/δ T-Zellen wurden bis jetzt im Mausmodell durchgeführt. Dies stellt eine weitere Einschränkung in der Vergleichbarkeit unserer Daten dar. Hier bedarf es weiterer Studien zur Quantifizierung der Verteilung und der einheitlichen Charakterisierung von Subpopulationen im Menschen.

Die oben beschriebene duale Rolle der γ/δ T-Zellen weist auf verschiedene Untergruppen in den γ/δ T-Zellen hin. Ribot et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass der Oberflächenmarker und Tumornekrosefaktor Rezeptor CD27 Rückschlüsse auf deren Zytokinprofil zulässt (Ribot et al. 2009). Hierbei zeigen **CD27+ γ/δ T-Zellen** eine INF γ -Produktion. INF γ gilt als antivirales Zytokin. CD27+ γ/δ T-Zellen üben daher TH1-Funktionen aus, welche die allergische Entzündung hemmen. **CD27- γ/δ T-Zellen** hingegen produzieren IL-17 und ähneln so in ihrer Funktion TH-17 Zellen. Diese fördern und erhalten unter anderem die allergische Reaktion des Körpers. (Ribot et al. 2009; Papotto, Ribot, and Silva-Santos 2017; Wang and Liu 2008)

Erst kürzlich wurden in einer Studie von Wang et al. u.a. CD27+/CD28+ und CD27-/CD28+ γ/δ T-Zellen sowie INF γ und IL-17 γ/δ T-Zellen aus dem PBMCs von allergischen Rhinitiker isoliert und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CD27+/CD28+ γ/δ T-Zellen und INF γ γ/δ T-Zellen signifikant erniedrigt sowie CD27-/CD28+/- γ/δ T-Zellen und IL-17 γ/δ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht waren. Durch positive Korrelation zwischen sowohl CD27+/CD28+ und INF γ γ/δ T-Zellen als auch CD27-/CD28+ und IL-17 γ/δ T-Zellen wurde auf das jeweilige Zytokinprofil der CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen geschlossen. (Wang et al. 2020) Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass CD27 als Oberflächenmarker der γ/δ T-Zellen auch im menschlichen Organismus mit deren Zytokinexpression vergesellschaftet ist. Allerdings wurde in der Studie von Wang et al. keine Zytokinsekretion gemessen, was es bei Interpretation der Daten zu beachten gilt.

DeBarros et al. konnten 2011 zeigen, dass CD27+ γ/δ T-Zellen aus dem Blut gesunder Probanden nach der Stimulation mit Phosphoantigen (PMA+ Ionomycin) intrazellulär INF γ , nicht jedoch IL-17 anreicherten. Überdies fanden sie heraus, dass die Zytokinproduktion durch CD27-Liganden (sCD70) erhöht war und durch die CD70-CD27 Blockade vermindert wurde. (DeBarros et al. 2011) Diese Studie stützt die These, dass humane CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen ein dem Mausmodell ähnliches Zytokinprofil aufweisen. Für die Zukunft zeigt sie mögliche Therapieansätze auf welche, über die CD70-CD27 Interaktion und die konsekutive TH1-Zytokinproduktion sowie die dadurch erhöhte Proliferationsrate und verlängerte Überlebensdauer der γ/δ T-Zellen, Krankheitsverläufe modulieren könnten. (Ribot et al. 2009; DeBarros et al. 2011) Die Interaktion von CD70-CD27 bei CD27+ γ/δ T-Zellen ist auch für die TH2

dominierten allergischen Erkrankungen ein vielversprechendes Forschungsgebiet mit möglichem therapeutischem Ansatz.

In der vorliegenden Arbeit wurden CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen im Sputum und Blut bestimmt und analog zu den γ/δ T-Zellen ausgewertet. Dies erfolgte mit dem Ziel, die zwei Subpopulationen in Bezug auf ihre Rolle in allergischen Atemwegserkrankungen näher zu untersuchen.

Im Vergleich von PBMCs und Sputum fiel ein interessantes Phänomen auf, welches im Folgenden als CD27+/CD27- γ/δ T-Zellinversion bezeichnet wird: Im Blut zeigt sich eine vermehrte Anzahl an CD27+ γ/δ T-Zellen ($57,7\% \pm 2,6\%$), während im Sputum die Anzahl vergleichsweise gering ist ($17,3\% \pm 1,4\%$). Bei den CD27- γ/δ T-Zellen verhält es sich genau umgekehrt. Hier gibt es viele CD27- γ/δ T-Zellen im Sputum ($81,9\% \pm 1,6\%$) und vergleichsweise wenige CD27- γ/δ T-Zellen im Blut ($41,4\% \pm 2,6\%$) (Mittelwert \pm SEM, Tabelle 14).

Die CD27+/CD27- γ/δ T-Zellinversion kann durch die Tatsache erklärt werden, dass CD27- γ/δ T-Zellen „Homing-Rezeptoren“ (CCR5 and CXCR3) für entzündetes Gewebe exprimieren (Dieli et al. 2003). Dies erklärt die Anreicherung der CD27- Zellen im Sputum der Probanden.

In-Season zeigte sich im Sputum eine spannende Verteilung der „antiallergischen“ CD27+ γ/δ T-Zellen und der „proallergischen“ CD27- γ/δ T-Zellen: So konnten wir zum einen zeigen, dass allergische Probanden ohne Immuntherapie (Median 9,6%) einen signifikant kleineren Anteil an CD27+ γ/δ T-Zellen im Sputum aufweisen als die Kontrollgruppe (Median 23,1%), im Gegensatz dazu aber einen signifikant höheren Anteil an CD27- γ/δ T-Zellen aufweisen. Allergiker ohne Immuntherapie wiesen bei den CD27- γ/δ T-Zellen einen Median von 90,9% und die Kontrollen einen Median von nur 78,2% auf. Bei Betrachtung der Allergiker mit Immuntherapie, scheint die AIT einen angleichenden Effekt auf die Subpopulationen zu haben. Die Werte für die Gruppe der Allergiker mit Immuntherapie lagen zwischen denen der Kontrollgruppe und denen der Allergiker ohne Immuntherapie. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese von einer „antiallergischen“ Funktion der CD27+ γ/δ T-Zellen und einer „proallergischen“ Funktion der CD27- γ/δ T-Zellen bei allergischen Atemwegserkrankungen.

Insgesamt fügen sich unsere Ergebnisse der Zellverteilung von CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen innerhalb der untersuchten Kohorten gut in die von Ribot et al. gezeigten

Zytokinprofile der CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen im Mausmodell ein (Ribot et al. 2009). Weitere Untersuchungen sind erforderlich um das Zytokinprofil von CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen aus induziertem Sputum vor dem Hintergrund allergischer Atemwegserkrankungen zu ermitteln.

Die CD27+/CD27- γ/δ T-Zell-Subpopulationen sind im Menschen noch nicht umfassend erforscht. Bisherige Forschungsergebnisse zu diesen Subpopulationen gibt es nur zu humanen CD27+/CD27- γ/δ T-Zellen aus Blut oder Lymphknoten. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit nach bestem Gewissen zum ersten Mal im Setting allergischer Atemwegserkrankungen CD27+/CD27- γ/δ T-Zellen im Sputum untersucht. Dies führt jedoch zu einer begrenzten Vergleichbarkeit unserer - aus dem Sputum gewonnenen - Daten mit denen aus anderen Biomatrizes. Die Ergebnisse zu den vergleichsweise gut erforschten CD27+/CD27- γ/δ T-Zellen im Mausmodell sind nur bedingt auf den menschlichen Organismus übertragbar. Es bedarf weiterer Studien, um der Rolle der humanen CD27+ und CD27- γ/δ T-Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen auf den Grund zu gehen.

In der vorliegenden Studie wurden die NKT-Zellen mittels der Oberflächenmarker CD3 und CD56 charakterisiert. Mittels dieser Marker ist es nicht möglich, eine CD1d-Restriktion der NKT-Zellen oder den invarianten T-Zell-Rezeptor nachzuweisen. Deshalb werden die CD3+CD56+ Zellen in der vorliegenden Arbeit als **NKT-like Zellen** bezeichnet (Thomas, Chyung, and Luster 2010; Bendelac, Savage, and Teyton 2007).

O'Reilly et al. zeigten, dass es drei Untergruppen der humanen NKT-Zellen gibt, CD4+/CD8-, CD4-/CD8+ und CD4-/CD8-. Jede dieser drei von O'Reilly et al. untersuchten Untergruppen zeigte ein unterschiedliches Zytokinprofil und unterschiedliche Expression des von uns benutzen NK-Zellmarkers CD56. In ihrer Studie charakterisierten O'Reilly et al. die NKT-Zellen mit folgenden T-Zellmarkern Va24Ja18 TCR, CD4, CD8 und mindestens einem der folgenden NK-Zellmarkern CD56, CD161 oder NKG2D. Den von uns gewählten NK-Zellmarker CD56 exprimierten in der Studie von O'Reilly et al. ein Großteil der CD8+ NKT-Zellen, in den doppelnegativen NKT-Zellen war die Expression unterschiedlich ausgeprägt, jedoch zeigte nur ein kleiner Anteil an CD4+ NKT-Zellen eine CD56+ Expression. (O'Reilly et al. 2011) Dies zeigt, dass die von uns gefärbten NKT-Zellen nur einen groben Überblick über deren Verteilung in PBMCs und Sputum geben können. Für weitere

Studien wäre es sinnvoll, die verschiedenen NKT-Zell-Subpopulationen mittels der spezifischeren Oberflächenmarker zu charakterisieren und mittels funktioneller Daten ihr Zytokinprofil in allergischen Atemwegserkrankungen zu untersuchen.

Die Rolle von NKT-Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass NKT-Zellen, wie auch γ/δ T-Zellen, mittels PE aus Zedernpollen stimuliert werden können (Agea et al. 2005). In der Literatur finden sich jedoch widersprüchliche Aussagen hinsichtlich ihrer Funktion und Frequenz im allergischen Setting.

So publizierte Akbari et al. 2006 erstmals im New England Journal of Medicine seine Ergebnisse zur Frequenz und Verteilung von NKT-Zellen in der Lunge (BAL) und im Blut von 14 asthmatischen Probanden, sechs Kontrollen und fünf Sarkoidose Probanden. Seine Daten zeigten in der Gruppe der Asthmatiker einen Anteil an NKT-Zellen an der pulmonalen CD3+ T-Zellpopulation von 73% (Mittelwert), während sich der Anteil an NKT-Zellen in der Kontrollgruppe und Sarkoidosegruppe auf ~1% belief. Darüber hinaus zeigten die NKT-Zellen der Asthmatiker eine starke IL-4 und IL-13 Produktion, aber nur eine schwache INF γ -Produktion nach Aktivierung mit α -Galactosylceramid. Daraufhin postulierte die Studiengruppe, dass NKT-Zellen eine prominente Rolle in der Entstehung von allergischem Asthma spielten. Diese These stützte sich unter anderem auf die durch Depletion von NKT-Zellen im Mausmodell gezeigte proallergische Rolle von NKT-Zellen in allergischem Asthma (Lisbonne et al. 2003).

In den folgenden Jahren wurde die Studie von Akbari et al. mehrfach widerlegt und postuliert, dass NKT-Zellen nicht die dominierende T-Zelluntergruppe in allergischem Asthma darstellen und nur einen modulierenden Effekt auf die Erkrankung haben. In der BAL konnten Thomas et al., mit derselben Methodik wie in der Studie von Akbari, nur einen Anteil von 2,7% NKT-Zellen an der CD3+ T-Zellpopulation identifizieren (Thomas, Chyung, and Luster 2010). Dies zeigt, wie unterschiedlich sich dieselbe Zell-Subpopulation im murinen und humanen Modell präsentieren kann und dass Vergleiche derselben schwierig sind.

Die von Akbari 2006 und Thomas 2010 erhobenen NKT-Zellwerte sind mit unseren nicht gut vergleichbar, da sie nicht über CD3+/CD56+ charakterisiert wurden, sondern mittels CD1d-Tetramer-Antikörpern und Reverse-Transkriptase-PCR des invarianten

T-Zellrezeptors erhoben wurden (Akbari et al. 2006; Thomas, Chyung, and Luster 2010).

Ergebnisse, die mit unseren direkt vergleichbar sind, liefert eine Studie von Hamzaoui et al., welche NKT-Zellen ebenfalls als CD3+CD56+ klassifizierte. In ihrer Studie wurden die CD3+CD56+ NKT-Zellen im Sputum schwerer Asthmatiker untersucht und ein mittlerer Anteil von 13.52% \pm 4.13% festgestellt, während die Werte in den Kontrollen bei 2.14% \pm 1.72% lagen (Hamzaoui et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden in den PBMCs ein Mittelwert von 2,3% \pm 0,3% (SEM) und im Sputum ein Anteil von 35,2% \pm 2,5% identifiziert (siehe Tabelle 14). Wir konnten zeigen, dass der Unterschied zwischen PBMCs und Sputum in allen Probandengruppen In- und Off-Season signifikant war.

In den PBMCs fanden wir eine höhere Prozentzahl von CD3+CD56+ NKT-Zellen als die bisher in Literatur beschriebenen 0,2% (Lee et al. 2002). Auch in den Sputumproben zeigten die NKT-like Zellen einen ~2-3-fachen Wert im Vergleich zu den Daten von Hamzaoui et al. 2006. Allerdings lagen diese mit 35,2% deutlich unter den widerlegten Werten von Akbari et al. 2006.

In der vorliegenden Arbeit ist auch die breite Streuung der NKT-like Zellanteile im Sputum auffallend. Betrachtet man die relativen Zellzahlen von CD3+ γ/δ T-Zellen und CD3+CD56+ NKT-like Zellen vorliegender Studie, so ergeben sich in der Summe sowohl im Sputum und als auch in den PBMCs mehr als 100%. Dies beruht nicht auf der Messung falsch positiver Events, sondern auf der Tatsache, dass es auch CD56+ γ/δ T-Zellen gibt (Van Acker et al. 2016; Urban et al. 2009) und dieser Anteil von uns in beiden Subpopulationen mitgemessen wurde. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die breite Streuung der NKT-Zellen im Sputum sowie für den vergleichsweise hohen NKT-like Zellanteil im Blut und Sputum sein. Für zukünftige Studien wäre es sinnvoll, vor der Messung von γ/δ T-Zellen und NKT-like Zellen jeweils CD56+ oder γ/δ TCR auszugaten, um so eine „reine“ Population zu messen.

Betrachtet man den Untergruppenvergleich In-Season im Sputum, so fällt in den Gruppen ohne Immuntherapie ein höherer Anteil an NKT-like Zellen in den allergischen Rhinitikern (AR-AIT Median 49,8%) als in der Untergruppe der allergischen Asthmatiker (AA-AIT 19,1%) auf. Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,055 als Trend an der Grenze zur Signifikanz zu bezeichnen. Dieses Ergebnis

könnte eine Folge der unzureichend therapierten allergischen Rhinitis im Kontrast zu gut kontrollierten allergischen Asthmatikern sein. Dies stellt eine mögliche Verzerrung unserer Studie dar, da nur Probanden mit kontrolliertem Asthma teilgenommen haben. Im Licht des One-Airway-One-Disease Konzepts (siehe Einleitung) ist dieses Ergebnis durchaus plausibel. Es konnte gezeigt werden, dass die nasale und die pulmonale Schleimhaut partiell den Entzündungsstatus widerspiegeln können (Amorim et al. 2010; Braunstahl et al. 2001). Zur Überprüfung dieser These in unserer Studie bräuchte man nasale Proben, um diese mit dem Sputum allergischer Rhinitiker zu vergleichen.

Der Effekt von spezifischer Immuntherapie auf die NKT-Zellpopulation im Blut wurde in einer Studie von Yan-ming et al. untersucht. Sie konnten zeigen, dass im Blut asthmatischer Kinder mit Immuntherapie die NKT-Zahl, im Vergleich zur Gruppe asthmatischer Kinder ohne Immuntherapie erhöht war. Zusätzlich waren die Zytokinproduktion der NKT-Zellen von IL-4 in der Asthmatikerkohorte mit Immuntherapie signifikant verringert und die IL-10 Produktion im Vergleich zur Asthmatiker Gruppe ohne Immuntherapie signifikant erhöht. (Yan-ming et al. 2012) Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte NKT-Zellen über die Produktion von INF γ die TH2-Differenzierung und IgE-Produktion hemmen können (Cui et al. 1999). Der Faktor Immuntherapie zeigte jedoch in der Studie von Yan-ming et al. keinen messbaren Einfluss auf die INF γ -Produktion der NKT-Zellen. In deren Gesamtheit weisen die Ergebnisse auf eine Immuntherapie bedingte Modulation der humanen NKT-Zellen hin, im Sinne eines antiallergischen Phänotyps (Yan-ming et al. 2012)

In der vorliegenden Studie zeigte sich im Sputum und den PBMCs in den Gruppen mit Immuntherapie ein tendenziell höherer Anteil an NKT-like Zellen als in den Gruppen ohne Immuntherapie. Allerdings ist dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$). Eine kleine Probandenanzahl und die breite Streuung der NKT-Zellzahlen sind mögliche Ursachen für die fehlende statistische Signifikanz. Dieser Trend könnte auf einen Effekt der Immuntherapie auf die NKT-Zellpopulation hinweisen, wie von Yan-ming et al. bereits 2012 im Blut beschrieben. Für weitere Untersuchungen sollten speziell die Untergruppen eine größere Anzahl an Probanden aufweisen; und wie oben bereits diskutiert, eine spezifischere Färbung und restriktive Gatingstrategie zur Charakterisierung von NKT-Zellen erfolgen.

Regulatorische T-Zellen wurden in verschiedenen Studien auf ihre Interaktion mit NKT-Zellen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass humane NKT Zellen, durch die Produktion von IL-2 regulatorische T-Zellen (Tregs) zur Proliferation anregen können (Jiang et al. 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Tregs durch Zell-zu-Zell-Kontakt die Proliferationsrate und Zytotoxizität der NKT-Zellen sowie deren Produktion von IL-4, IL-13, IL-10 und INF γ hemmen (Azuma et al. 2003). In Abbildung 44 ist modifiziert nach Juno et al. die Interaktionen von iNKT-Zellen u. a. mit Tregs skizziert (Juno, Keynan, and Fowke 2012a).

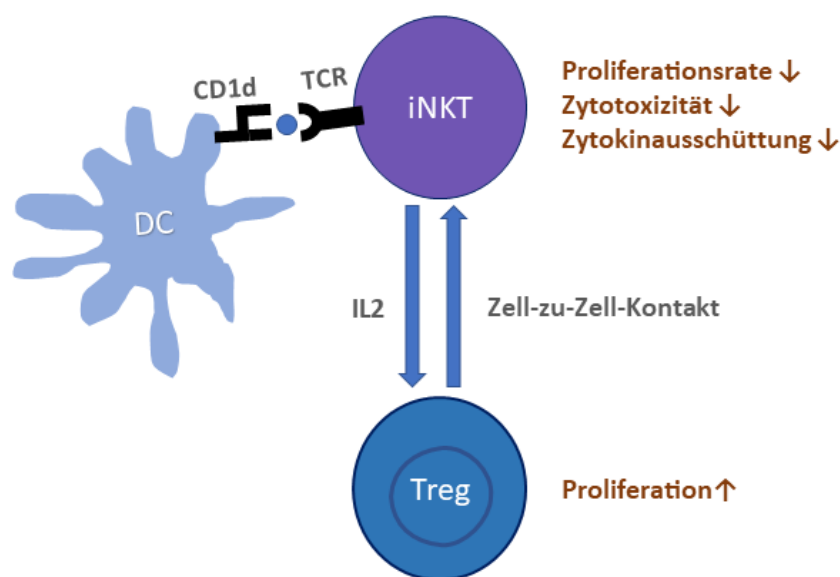


Abbildung 44: Interaktionen von iNKT-Zellen mit Tregs und dendritischen Zellen – Modifiziert und ins Deutsche übersetzt nach Juno, J.A., Y. Keynan, and K.R. Fowke (2012), *Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection*, Licensed under CC BY 2.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420949/> on 31.01.2022 (Juno, Keynan, and Fowke 2012b)

Die Interaktion von regulatorischen T-Zellen und NKT-Zellen in allergischen Atemwegserkrankungen ist allerdings bisher noch wenig erforscht, wäre aber besonders in Bezug auf die durch Immuntherapie expandierenden regulatorischen T-Zellen von großem Interesse.

Die Studiengruppe um Nguyen et al. konnte mittels intrazellulärer Färbung zeigen, dass CD4+ NKT-Zellen von Probanden mit allergischem Asthma einen erhöhten Anteil an Granzym B und Perforin aufwiesen als die von gesunden Probanden. Überdies konnte in vitro gezeigt werden, dass die NKT-Zellen asthmatischer Probanden eine

höhere Zytotoxizität gegenüber CD4+CD25^{hi} CD127^{lo/-} regulatorische T-Zellen aufwiesen als jene gesunder Probanden (Nguyen, Vanichsarn, and Nadeau 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden die relative Anzahl an CD25⁺ T-Zellen mit denen der NKT-like Zellen im Blut und Sputum korreliert. Unsere Daten aus dem Sputum fügen sich in die von Nguyen 2008 gezeigten Interaktionen ein. Die NKT-like Zellen der Allergiker ohne Immuntherapie (A-AIT) weisen eine negative Korrelation mit den CD25⁺ T-Zellen auf. Betrachtet man die Allergiker mit Immuntherapie (A+AIT) In-Season so zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation. Allerdings zeigt sich Off-Season eine positive Korrelation zwischen NKT-like und CD25⁺ T-Zellen. Dieses Ergebnis könnte auf eine Aufhebung des zytotoxischen Effekts der NKT-like Zellen auf CD25⁺ T-Zellen in Allergikern durch die Immuntherapie schließen lassen.

Die Korrelationsdaten aus den PBMCs zeigen interessanterweise ein inverses Bild (siehe Anhang). In den Allergikern ohne Immuntherapie (A-AIT) zeigt sich In-Season eine positive Korrelation zwischen NKT-like Zellen und CD25⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu weisen NKT-like Zellen und CD25⁺ T-Zelle in Allergikern mit Immuntherapie (A+AIT) eine negative Korrelation auf. Diese Inversion von Sputum und PBMC konnten wir unter anderem auch in den CD27⁺/CD27⁻ γ/δ T-Zellen zeigen. Sie spielt eine zentrale Rolle für das Verständnis von lokaler und systemischer Beteiligung in allergischen Atemwegserkrankungen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend gibt es Hinweise auf einen möglichen Effekt der Immuntherapie auf die Interaktion von NKT-like Zellen und CD25⁺ T-Zellen im Sputum allergischer Probanden. Dieses sehr spannende Interaktionspotential muss jedoch mittels weiterer Verfahren untersucht werden. Zum einen müssten sowohl die NKT Zellen als auch die regulatorischen T-Zellen besser charakterisiert werden (siehe jeweilige Diskussion). Zum anderen reicht, um einen gesicherten Zusammenhang festzustellen, die positive oder negative Korrelation nicht aus. Sie zeigt uns als statistisches Mittel keine Kausalität an. Um die direkte Zellinteraktion im Allergiemodell zu erforschen, bedarf es weiterer Untersuchungsmethoden, z. B. der Zellkultur.

6 Anhang

Durchflusszytometrie-Ergebnisse der PBMCs und Korrelation von NKT-like Zellen und CD25+ T-Zellen im Blut.

6.1 T-Zellen in PBMCs

CD5+/CD3+ T-Zellen in PBMCs

Gruppenvergleich

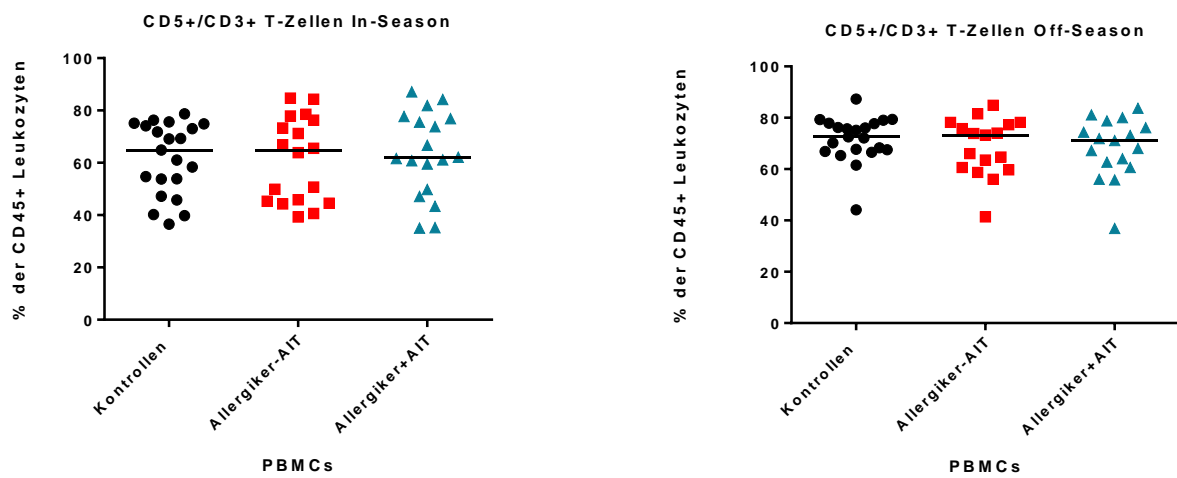


Abbildung 45: Gruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In- und Off-Season bestehen in der CD5+/CD3+ T-Zellpopulation in den PBMCs keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$)

Untergruppenvergleich

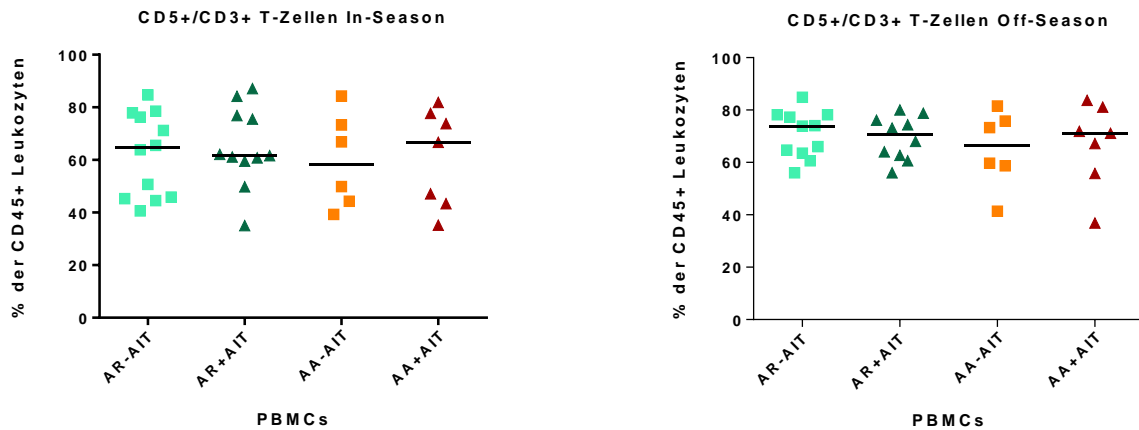


Abbildung 46: Untergruppenvergleich der relativen CD5+/CD3+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

Im Vergleich der Untergruppen zeigen sich in der CD5+/CD3+ T-Zellpopulation in den PBMCs In-Season und Off-Season keine signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test ($p > 0,05$).

CD5+/CD3+/CD25+ T-Zellen in PBMCs

Gruppenvergleich

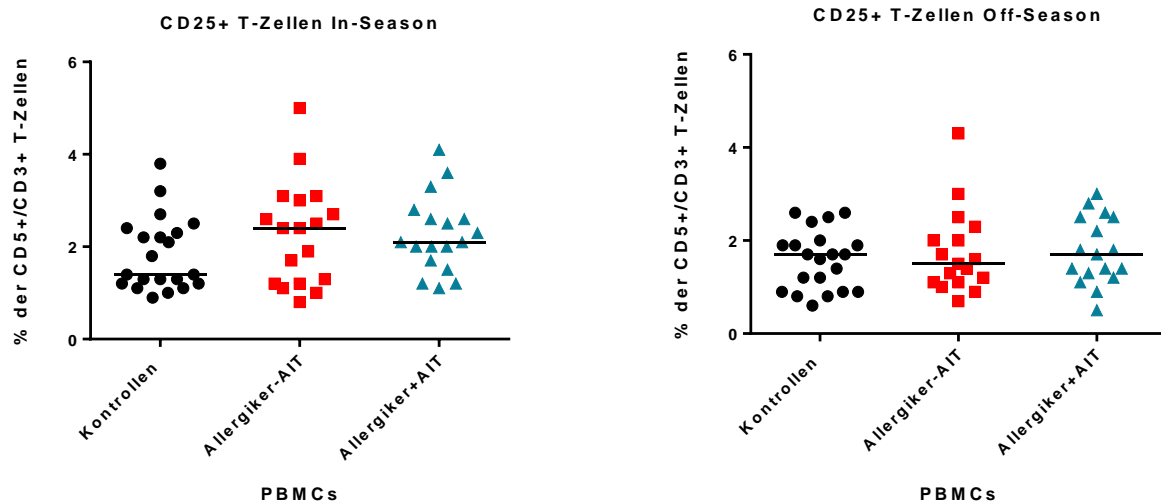


Abbildung 47: Gruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

Die CD25+ T-Zellen in den PBMCs zeigen In-Season und Off-Season keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Untergruppenvergleich

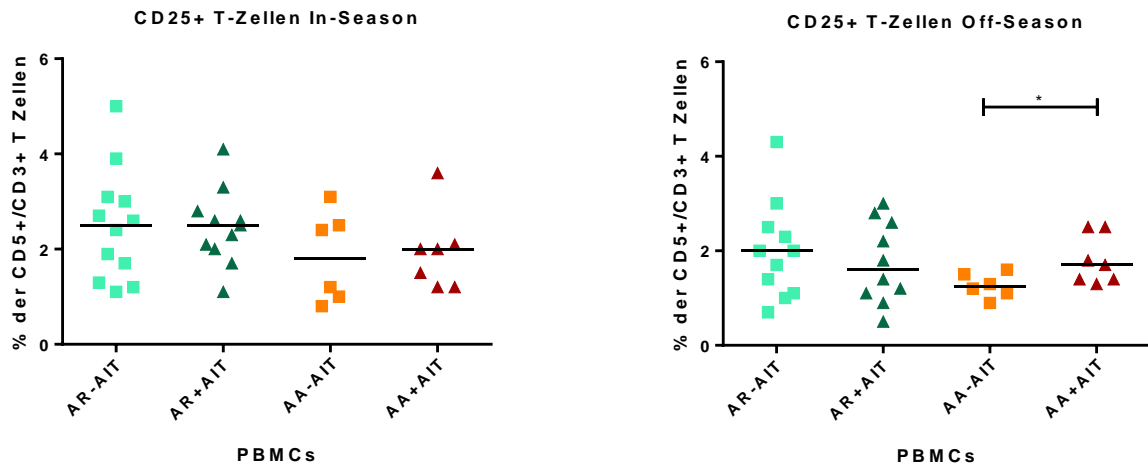


Abbildung 48: Untergruppenvergleich der relativen CD25+ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

Die relative Anzahl der CD25+ T-Zellen zeigt zwischen den Untergruppen in PBMCs der allergischen Probanden keinen signifikanten Unterschied während der In-Season (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Während der Off-Season zeigt sich in der Gruppe der Asthmatiker ein signifikanter Unterschied zwischen Probanden mit und ohne Immuntherapie. Der Median in AA-AIT liegt bei 1,25 % und der Median der AA+AIT bei 1,70% (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

6.1.1.1 γ/δ T-Zellen in PBMCs

γ/δ T-Zellen

Gruppenvergleich

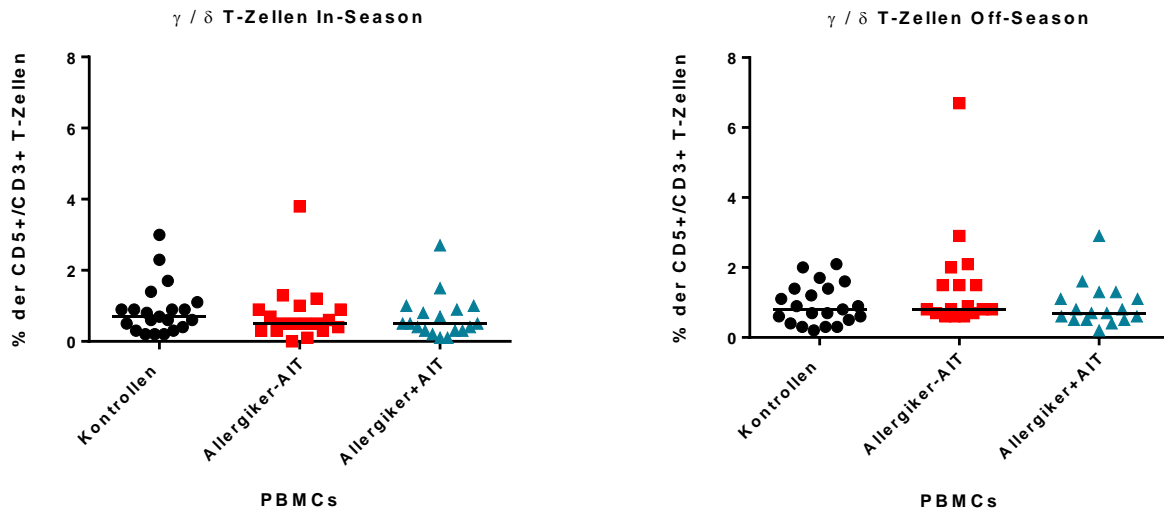


Abbildung 49: Gruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In- und Off-Season bestehen in der γ/δ T-Zellpopulation im Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$)

Untergruppenvergleich

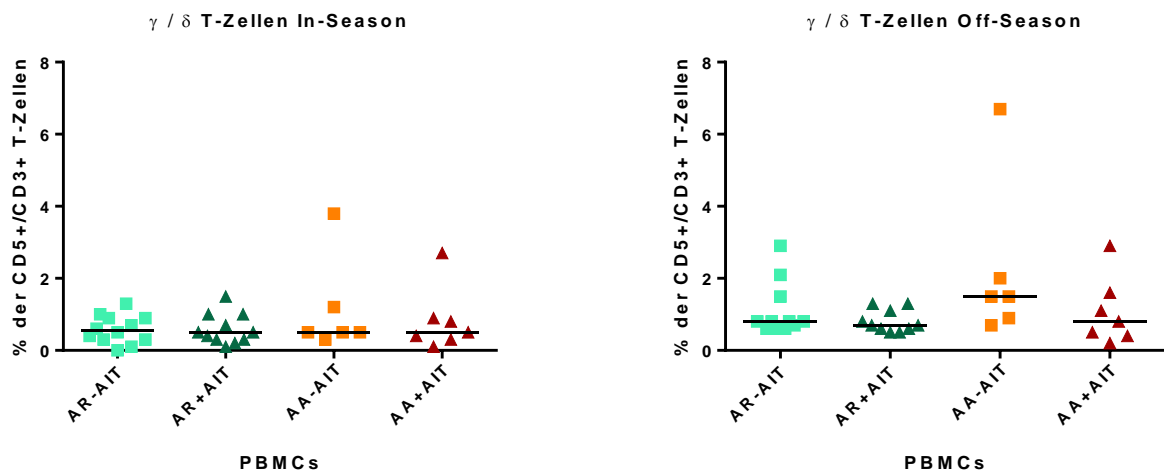


Abbildung 50: Untergruppenvergleich der relativen γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

Weder In-Season noch Off-Season sieht man im Vergleich der Untergruppen signifikante Unterschiede in den γ/δ T-Zellverteilungen der PBMC (Mann-Whitney-U Test, $p > 0,05$).

CD27+ γ/δ T-Zellen

Gruppenvergleich

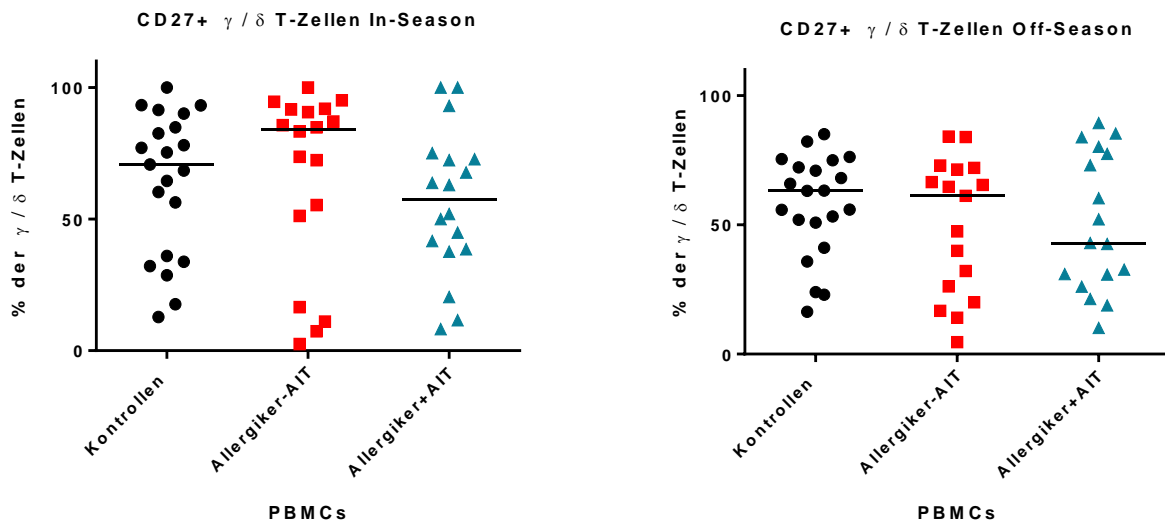


Abbildung 51: Gruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In-Season und Off-Season zeigen sich in den CD27+ γ/δ T-Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$)

Untergruppenvergleich

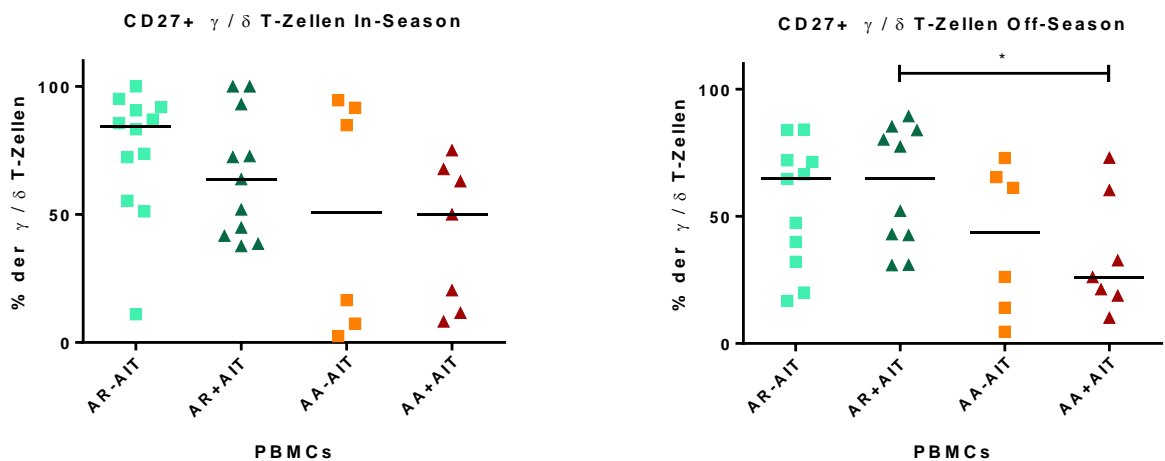


Abbildung 52: Untergruppenvergleich der relativen CD27+ γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

Betrachtet man die Untergruppen, so finden sich In-Season keine signifikanten Unterschiede in der CD27+ γ/δ T-Zellpopulation (Mann-Whitney-U-test, $p > 0,05$).

Off-Season zeigt sich zwischen der Untergruppe der allergischen Rhinitiker mit Immuntherapie (AR+AIT, Median 64,75%) und der Untergruppe der allergischen

Asthmatiker mit Immuntherapie (AA+AIT, Median 26,10%) ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$).

CD27- γ/δ T-Zellen

Gruppenvergleich

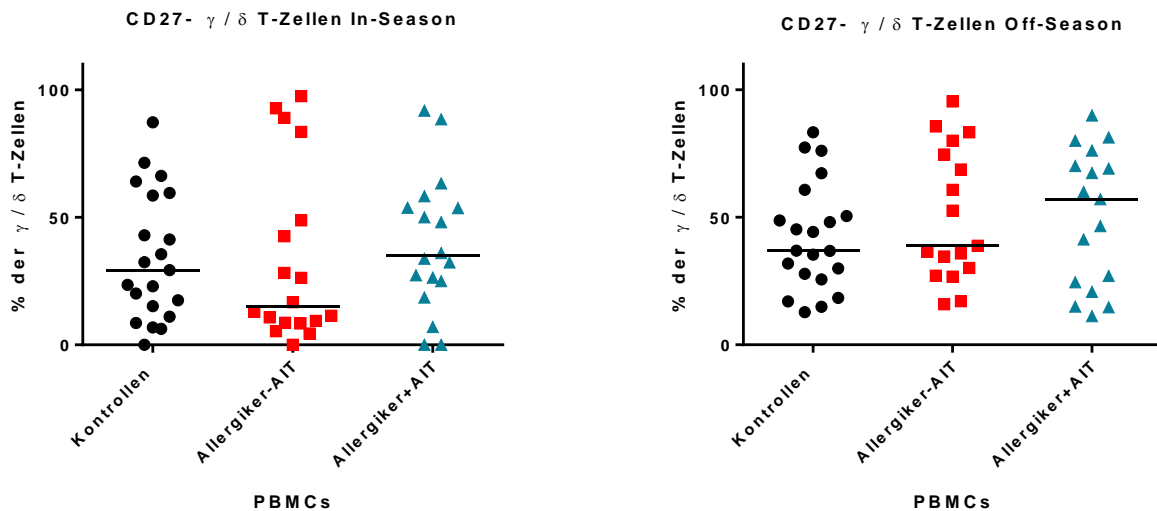


Abbildung 53: Gruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In- und Off-Season weisen die Gruppen in den CD27- γ/δ T-Zellen keine Unterschiede von statistischer Signifikanz auf (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Untergruppenvergleich

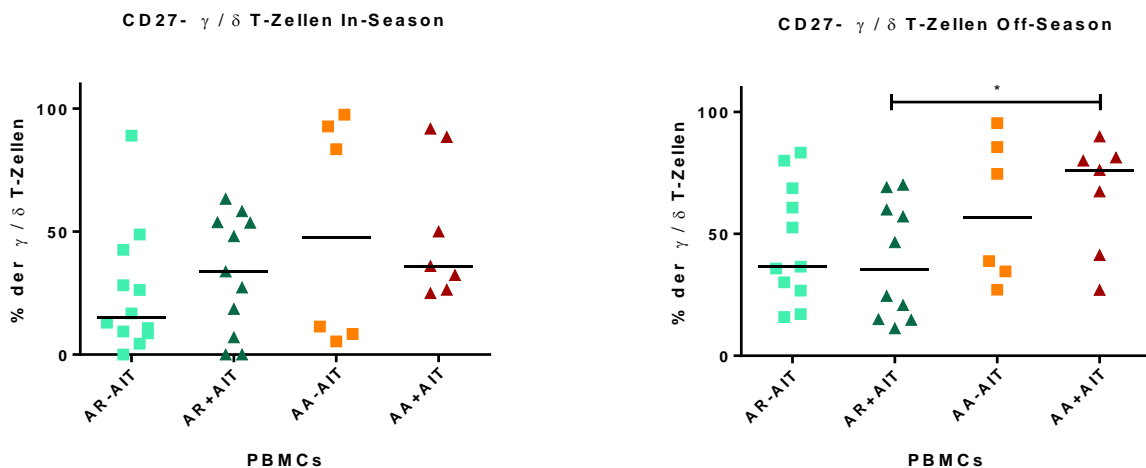


Abbildung 54: Untergruppenvergleich der relativen CD27- γ/δ T-Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In-Season zeigt der Untergruppenvergleich der CD27- γ/δ T-Zellen in den PBMCs keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Off-Season zeigt sich zwischen der Gruppe der allergischen Rhinitiker mit Immuntherapie (AR+AIT, Median 35,50%) und der Gruppe der allergischen Asthmatiker mit Immuntherapie (AA+AIT, Median 76,10%) ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$). Dieses Ergebnis verhält sich gegenläufig zu jenem hinsichtlich der CD27+ γ/δ T-Zellen.

6.1.1.2 NKT-like-Zellen

Gruppenvergleich

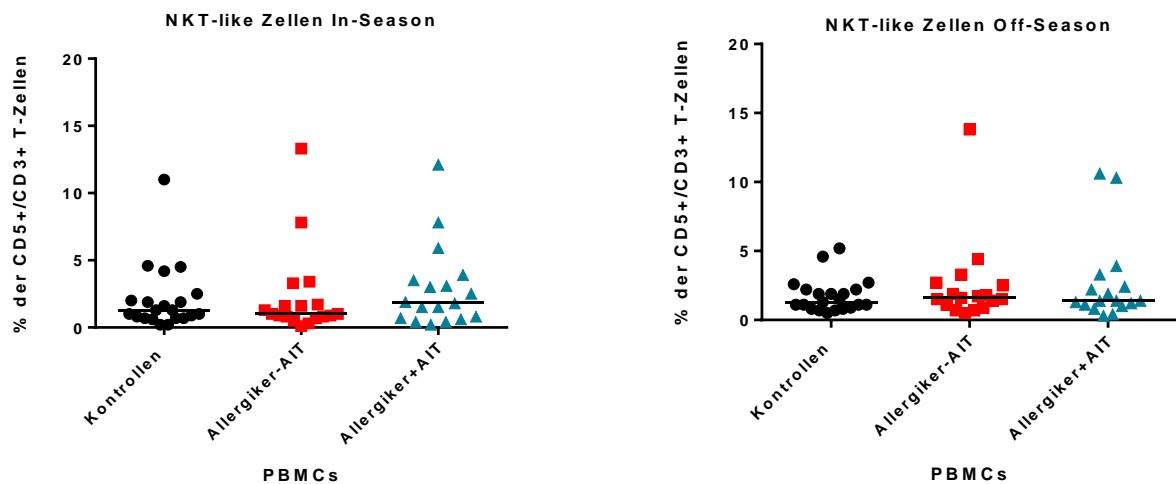


Abbildung 55: Gruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In beiden Diagrammen wird die NKT-like Zellsubpopulation In- und Off-Season dargestellt. Statistisch finden sich zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Untergruppenvergleich

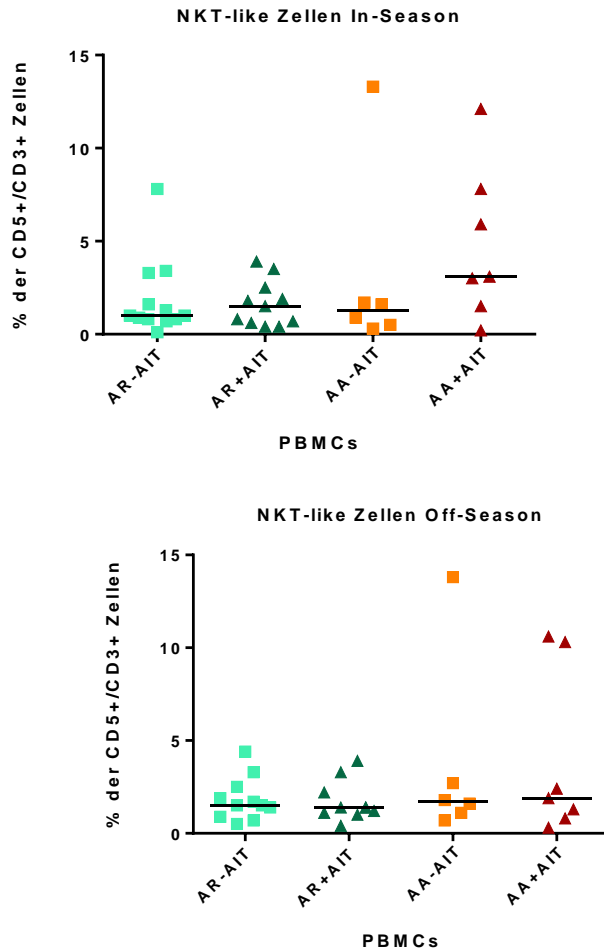


Abbildung 56: Untergruppenvergleich der relativen NKT-like Zellzahl, In- und Off-Season, PBMCs

In-Season und Off-Season zeigt die NKT-like Zellverteilung in den Untergruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$)

6.2 PBMCs: Korrelationen von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen

Alle Gruppen In- und Off-Season in den PBMCs

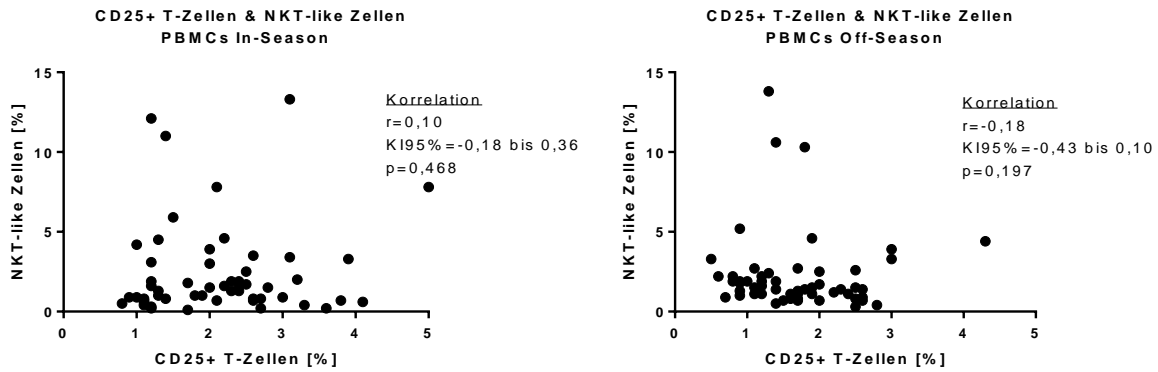


Abbildung 57: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; alle Probanden

Beide Graphen zeigen, dass NKT-like und CD25+ T-Zellen, wenn man die Werte aller Probanden analysiert, nicht miteinander korrelieren (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,10$ und $r = -0,18$; $p > 0,05$).

Gesunde In- und Off-Season in den PBMCs

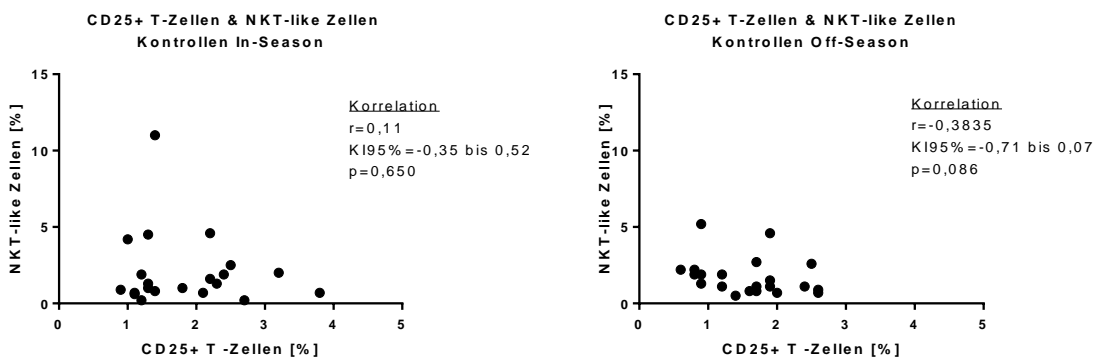


Abbildung 58: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; Kontrollen

In beiden Kontrollgruppen zeigen die Korrelation zwischen CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen keine statistische Signifikanz (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,11$ und $r = -0,38$; $p > 0,05$).

Effekt von Immuntherapie (AIT) auf die Korrelation in den PBMCs

PBMCs – Allergiker ohne Immuntherapie

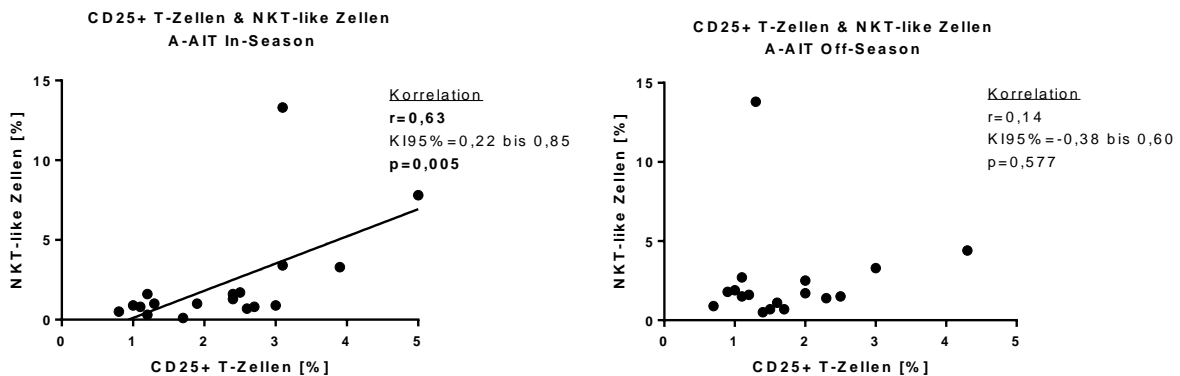


Abbildung 59: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; A-AIT

In allergischen Probanden ohne Immuntherapie zeigt sich in der Pollenflugsaison eine signifikante Zunahme der NKT-like Zellen, je mehr CD25+ T-Zellen registriert wurden (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,63$, $p < 0,01$).

Außerhalb der Pollenflugsaison kann diese positive Korrelation nicht beobachtet werden ($p > 0,05$).

PBMCs – Allergiker mit Immuntherapie

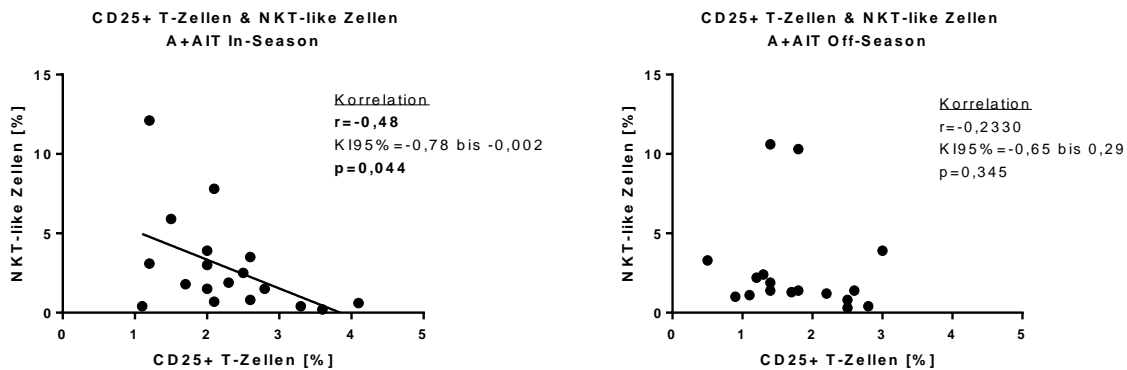


Abbildung 60: Korrelation des prozentualen Anteils von CD25+ T-Zellen und NKT-like Zellen In-Season und Off-Season; PBMCs; A+AIT

Der Effekt, der sich bei Allergikern ohne Immuntherapie darstellt, kommt bei Allergikern mit Immuntherapie invers zu tragen. CD25+ T-Zellen korrelieren In-Season unter Immuntherapie negativ mit den NKT-like Zellen in den PBMCs (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = -0,48$, $p < 0,05$).

Off-Season ist dieser Effekt nicht zu beobachten ($p > 0,05$).

7 Literaturverzeichnis

- (GINA), Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2020 update). In *Global Initiative for Asthma (GINA). Stand: 2020*. Abgerufen von <https://ginasthma.org/gina-reports/> am 07.12.2020.
- Agea, E., A. Russano, O. Bistoni, R. Mannucci, I. Nicoletti, L. Corazzi, A. D. Postle, G. De Libero, S. A. Porcelli, and F. Spinozzi. 2005. "Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens." *J Exp Med* 202 (2):295-308. doi: 10.1084/jem.20050773.
- Akbari, O., J. L. Faul, E. G. Hoyte, G. J. Berry, J. Wahlstrom, M. Kronenberg, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2006. "CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma." *N Engl J Med* 354 (11):1117-29. doi: 10.1056/NEJMoa053614.
- Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2004. "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." *J Exp Med* 199 (11):1567-75. doi: 10.1084/jem.20032058.
- Allison, T. J., C. C. Winter, J. J. Fournie, M. Bonneville, and D. N. Garboczi. 2001. "Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor." *Nature* 411 (6839):820-4. doi: 10.1038/35081115.
- Altmeyer, Prof. Dr. med. Peter. 2017. "Interleukin-5." In *Altmeyers Enzyklopädie*. Abgerufen von <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/allergologie/interleukin-5-15407#authors> am 31.01.2021.
- Amorim, M. M., A. Araruna, L. B. Caetano, A. C. Cruz, L. L. Santoro, and A. L. Fernandes. 2010. "Nasal eosinophilia: an indicator of eosinophilic inflammation in asthma." *Clin Exp Allergy* 40 (6):867-74. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03439.x.
- Averbeck, M., C. Gebhardt, F. Emmrich, R. Treudler, and J. C. Simon. 2007. "Immunologische Grundlagen der Allergien." *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 5 (11). doi: 10.1111/j.1610-0387.2007.06538.x.
- Azuma, T., T. Takahashi, A. Kunisato, T. Kitamura, and H. Hirai. 2003. "Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions." *Cancer Res.* 63 (15):4516-20. PMID: 12907625.
- Bank, I., R. A. DePinho, M. B. Brenner, J. Cassimeris, F. W. Alt, and L. Chess. 1986. "A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes." *Nature* 322 (6075):179-81. doi: 10.1038/322179a0.
- Bendelac, A., P. B. Savage, and L. Teyton. 2007. "The biology of NKT cells." *Annu Rev Immunol* 25:297-336. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- Bousquet, J., I. Annesi-Maesano, F. Carat, D. Leger, M. Rugina, C. Pribil, A. El Hasnaoui, and I. Chanal. 2005. "Characteristics of intermittent and persistent allergic rhinitis: DREAMS study group." *Clin Exp Allergy* 35 (6):728-32. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02274.x.

- Bousquet, J., P. W. Hellings, I. Agache, F. Amat, I. Annesi-Maesano, I. J. Ansotegui, J. M. Anto, C. Bachert, E. D. Bateman, A. Bedbrook, K. Bennoor, M. Bewick, C. Bindslev-Jensen, S. Bosnic-Anticevich, I. Bosse, J. Brozek, L. Brussino, G. W. Canonica, V. Cardona, T. Casale, A. M. Cepeda Sarabia, N. H. Chavannes, L. Cecchi, J. Correia de Sousa, E. Costa, A. A. Cruz, W. Czarlewski, G. De Carlo, G. De Feo, P. Demoly, P. Devillier, M. S. Dykewicz, Y. El-Gamal, E. E. Eller, J. A. Fonseca, J. F. Fontaine, W. J. Fokkens, M. A. Guzman, T. Haahtela, M. Illario, J. C. Ivancevich, J. Just, I. Kaidashev, M. Khaitov, O. Kalayci, T. Keil, L. Klimek, M. L. Kowalski, P. Kuna, V. Kvedariene, D. Larenas-Linnemann, D. Laune, L. T. T. Le, K. L. Carlsen, O. Lourenco, B. Mahboub, A. Mair, E. Menditto, B. Milenkovic, M. Morais-Almeida, R. Mosges, J. Mullol, R. Murray, R. Naclerio, L. Namazova-Baranova, E. Novellino, R. E. O'Hehir, K. Ohta, Y. Okamoto, K. Okubo, G. L. Onorato, S. Palkonen, P. Panzner, N. G. Papadopoulos, H. S. Park, E. Paulino, R. Pawankar, O. Pfaar, D. Plavec, T. A. Popov, P. Potter, E. P. Prokopakis, M. Rottem, D. Ryan, J. Salimaki, B. Samolinski, M. Sanchez-Borges, H. J. Schunemann, A. Sheikh, J. C. Sisul, R. Rajabian-Soderlund, T. Sooronbaev, C. Stellato, T. To, A. M. Todo-Bom, P. V. Tomazic, S. Toppila-Salmi, A. Valero, A. Valiulis, E. Valovirta, M. T. Ventura, M. Wagenmann, Y. Wang, D. Wallace, S. Wasserman, M. Wickman, A. Yorgancioglu, L. Zhang, N. Zhong, M. Zidarn, T. Zuberbier, and Group Mobile Airways Sentinel Network Study. 2019. "Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Phase 4 (2018): Change management in allergic rhinitis and asthma multimorbidity using mobile technology." *J Allergy Clin Immunol* 143 (3):864-879. doi: 10.1016/j.jaci.2018.08.049.
- Braunstahl, G. J., S. E. Overbeek, A. Kleinjan, J. B. Prins, H. C. Hoogsteden, and W. J. Fokkens. 2001. "Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways." *J Allergy Clin Immunol* 107 (3):469-76. doi: 10.1067/mai.2001.113046.
- Brehler, R., L. Klimek, M. V. Kopp, and J. C. Virchow. 2013. "Spezifische Immuntherapie – Indikation und Wirkungsweise." *Dtsch Arztebl International* 110 (9):148-58. doi: 10.3238/arztebl.2013.0148.
- Brenner, M. B., J. McLean, D. P. Dialynas, J. L. Strominger, J. A. Smith, F. L. Owen, J. G. Seidman, S. Ip, F. Rosen, and M. S. Krangel. 1986. "Identification of a putative second T-cell receptor." *Nature* 322 (6075):145-9. doi: 10.1038/322145a0.
- Brozek, J. L., J. Bousquet, I. Agache, A. Agarwal, C. Bachert, S. Bosnic-Anticevich, R. Brignardello-Petersen, G. W. Canonica, T. Casale, N. H. Chavannes, J. Correia de Sousa, A. A. Cruz, C. A. Cuello-Garcia, P. Demoly, M. Dykewicz, I. Etzeandia-Ikobaltzeta, I. D. Florez, W. Fokkens, J. Fonseca, P. W. Hellings, L. Klimek, S. Kowalski, P. Kuna, K. T. Laisaar, D. E. Larenas-Linnemann, K. C. Lodrup Carlsen, P. J. Manning, E. Meltzer, J. Mullol, A. Muraro, R. O'Hehir, K. Ohta, P. Panzner, N. Papadopoulos, H. S. Park, G. Passalacqua, R. Pawankar, D. Price, J. J. Riva, Y. Roldan, D. Ryan, B. Sadeghirad, B. Samolinski, P. Schmid-Grendelmeier, A. Sheikh, A. Togias, A. Valero, A. Valiulis, E. Valovirta, M. Ventresca, D. Wallace, S. Wasserman, M. Wickman, W. Wiercioch, J. J. Yepes-Nunez, L. Zhang, Y. Zhang, M. Zidarn, T. Zuberbier, and H. J. Schunemann. 2017. "Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision." *J Allergy Clin Immunol* 140 (4):950-958. doi: 10.1016/j.jaci.2017.03.050.

- Buhl, R., R. Bals, X. Baur, D. Berdel, C.-P. Criée, M. Gappa, A. Gillissen, and A. Zacharasiewicz. 2017. S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Deutsche Atemwegsliga. Stand 2017. Abgerufen von https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-009l_S3_Asthma_Diagnostik_Therapie_2017-11.pdf am 31.01.2022: AWMF online.
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). 2020. Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma. In – *Langfassung, 4. Auflage. Version 1. 2020*. Abgerufen von www.asthma.versorgungsleitlinien.de am 01.02.2022. doi: 10.6101/AZQ/000469.
- Calderon, M. A., S. Wasserman, D. I. Bernstein, P. Demoly, J. Douglass, R. Gagnon, C. H. Katelaris, H. Kim, H. S. Nelson, Y. Okamoto, K. Okubo, J. C. Virchow, L. DuBuske, T. B. Casale, G. W. Canonica, and H. Nolte. 2020. "Clinical Practice of Allergen Immunotherapy for Allergic Rhinoconjunctivitis and Asthma: An Expert Panel Report." *J Allergy Clin Immunol Pract* 8 (9):2920-2936 e1. doi: 10.1016/j.jaip.2020.04.071.
- Carding, S. R., and P. J. Egan. 2002. "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." *Nat Rev Immunol* 2 (5):336-45. doi: 10.1038/nri797.
- Chiba, Y., S. Nakazawa, M. Todoroki, K. Shinozaki, H. Sakai, and M. Misawa. 2009. "Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein." *Am J Respir Cell Mol Biol* Feb 40 (2):159-67. doi: 10.1165/rcmb.2008-0162OC.
- Christmas, S. E., R. Brew, G. Deniz, and J. J. Taylor. 1993. "T-cell receptor heterogeneity of gamma delta T-cell clones from human female reproductive tissues." *Immunology* 78 (3):436-43. PMID: 8386698.
- Ciprandi, G., and I. Cirillo. 2011. "Monosensitization and polysensitization in allergic rhinitis." *Eur J Intern Med* 22 (6):e75-9. doi: 10.1016/j.ejim.2011.05.009.
- Cohen, J. 1992. "A power primer." *Psychological Bulletin* 112 (1):155-159. doi: 10.1037//0033-2909.112.1.155
- Coombs, R., and P. Gell. 1963. "The classification of allergic reactions underlying disease." In *Clinical aspects of immunology*, S. 317-337. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Coquet, J. M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F. W. McNab, L. A. Pitt, B. S. McKenzie, S. P. Berzins, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2008. "Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (32):11287-92. doi: 10.1073/pnas.0801631105.
- Cron, R. Q., T. F. Gajewski, S. O. Sharrow, F. W. Fitch, L. A. Matis, and J. A. Bluestone. 1989. "Phenotypic and functional analysis of murine CD3+,CD4-,CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells." *J Immunol* 142 (11):3754-62, PMID: 2523934.
- Cui, J., N. Watanabe, T. Kawano, M. Yamashita, T. Kamata, C. Shimizu, M. Kimura, E. Shimizu, J. Koike, H. Koseki, Y. Tanaka, M. Taniguchi, and T. Nakayama. 1999. "Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin

- E response by ligand-activated Valpha14 natural killer T cells." *J Exp Med* 190 (6):783-92. doi: 10.1084/jem.190.6.783.
- Culpepper, J. A., and F. Lee. 1985. "Regulation of IL 3 expression by glucocorticoids in cloned murine T lymphocytes." *J Immunol* 135 (5):3191-7, PMID: 2931480.
- de Groot, E. P., A. Nijkamp, E. J. Duiverman, and P. L. Brand. 2012. "Allergic rhinitis is associated with poor asthma control in children with asthma." *Thorax* 67 (7):582-7. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201168.
- de la Fuente, Philippe Tarodo, Micaela Romagnoli, Philippe Godard, Jean Bousquet, and Pascal Chanez. 1998. "Safety of Inducing Sputum in Patients with Asthma of Varying Severity." *American journal of respiratory and critical care medicine* 157:1127-30. doi: 10.1164/ajrccm.157.4.9610008.
- DeBarros, A., M. Chaves-Ferreira, F. d'Orey, J. C. Ribot, and B. Silva-Santos. 2011. "CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human gammadelta peripheral blood lymphocytes." *Eur J Immunol* 41 (1):195-201. doi: 10.1002/eji.201040905.
- Dhami, S., A. Kakourou, F. Asamoah, I. Agache, S. Lau, M. Jutel, A. Muraro, G. Roberts, C. A. Akdis, M. Bonini, O. Cavkaytar, B. Flood, P. Gajdanowicz, K. Izuhara, Ö Kalayci, R. Mosges, O. Palomares, O. Pfaar, S. Smolinska, M. Sokolowska, M. Asaria, G. Netuveli, H. Zaman, A. Akhlaq, and A. Sheikh. 2017. "Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis." *Allergy* 72 (12):1825-1848. doi: 10.1111/all.13208
- Dieli, F., F. Poccia, M. Lipp, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano, and A. Salerno. 2003. "Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites." *J Exp Med* 198 (3):391-7. doi: 10.1084/jem.20030235.
- Eberl, M., M. Hintz, A. Reichenberg, A. K. Kollas, J. Wiesner, and H. Jomaa. 2003. "Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation." *FEBS Lett* 544 (1-3):4-10. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00483-6.
- Everson, Todd M., Genevieve Lyons, Hongmei Zhang, Nelís Soto-Ramírez, Gabrielle A. Lockett, Veeresh K. Patil, Simon K. Merid, Cilla Söderhäll, Erik Melén, John W. Holloway, S. Hasan Arshad, and Wilfried Karmaus. 2015. "DNA methylation loci associated with atopy and high serum IgE: a genome-wide application of recursive Random Forest feature selection." *Genome medicine* 7 (1):89-89. doi: 10.1186/s13073-015-0213-8.
- Fehrenbach, H., C. Wagner, and M. Wegmann. 2017. "Airway remodeling in asthma: what really matters." *Cell Tissue Res* 367 (3):551-569. doi: 10.1007/s00441-016-2566-8.
- Fujita, H., M. B. Soyka, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2012a. "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Clin Transl Allergy* 2 (1):2. doi: 10.1186/2045-7022-2-2.
- Fujita, H., M. B. Soyka, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2012b. Mechanisms of allergen-specific Immunotherapy, Licensed under CC BY 2.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395833/#> am 25.01.2022. In *Clinical and translational allergy*: BioMed Central. doi: 10.1186/2045-7022-2-2.

- Galli, S. J., and M. Tsai. 2012. "IgE and mast cells in allergic disease." *Nat Med* 18 (5):693-704. doi: 10.1038/nm.2755.
- Galli, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky. 2008. "The development of allergic inflammation." *Nature* 454 (7203):445-54. doi: 10.1038/nature07204.
- Garcia, B. E., M. L. Sanz, J. J. Gato, J. Fernandez, and A. Oehling. 1993. "IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine." *J Investig Allergol Clin Immunol* 3 (1):26-33, PMID: 7506621.
- Gargano, D., C. Romano, F. Manguso, M. Cutajar, P. Altucci, and C. Astarita. 2002. "Relationship between total and allergen-specific IgE serum levels and presence of symptoms in farm workers sensitized to *Tetranychus urticae*." *Allergy* 57 (11):1044-7. doi: 10.1034/j.1398-9995.2002.23745.x
- Gillissen, A. 2012. "Remodeling in asthma, a comprehensive review." *Pneumologie* 66 (6):345-54; quiz 355. doi: 10.1055/s-0032-1309753.
- Gould, H. J., and B. J. Sutton. 2008. "IgE in allergy and asthma today." *Nat Rev Immunol* 8 (3):205-17. doi: 10.1038/nri2273.
- Grainge, C. L., L. C. Lau, J. A. Ward, V. Dulay, G. Lahiff, S. Wilson, S. Holgate, D. E. Davies, and P. H. Howarth. 2011. "Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma." *N Engl J Med* 364 (21):2006-15. doi: 10.1056/NEJMoa1014350.
- Grossman, J. 1997. "One airway, one disease." *Chest* 111 (2 Suppl):11s-16s. doi: 10.1378/chest.111.2_supplement.11s.
- Guntinas-Lichius, O., J. Klußmann, and S. Lang. 2021a. "Kapitel 33.1." In *Referenz HNO-Heilkunde*, S. 393-394. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. doi: 10.1055/b-0041-181592.
- Guntinas-Lichius, O., J. Klußmann, and S. Lang. 2021b. "Kapitel 33.1.9." In *Referenz HNO-Heilkunde*, S. 394-397. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. doi: 10.1055/b-0041-181592.
- Hamzaoui, A., J. Ammar, and K. Hamzaoui. 2010. "Regulatory T cells in induced sputum of asthmatic children: association with inflammatory cytokines." *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 5 (1):22. doi: 10.1186/2049-6958-5-1-22.
- Hamzaoui, A., S. Cheik Rouhou, H. Grairi, H. Abid, J. Ammar, H. Chelbi, and K. Hamzaoui. 2006. "NKT cells in the induced sputum of severe asthmatics." *Mediators Inflamm* 2006 (2):71214. doi: 10.1155/mi/2006/71214.
- Hamzaoui, A., A. Kahan, K. Ayed, and K. Hamzaoui. 2002. "T cells expressing the gammadelta receptor are essential for Th2-mediated inflammation in patients with acute exacerbation of asthma." *Mediators Inflamm* 11 (2):113-9. doi: 10.1080/09629350220131971.
- Hanf, G., O. Noga, U. Ohnemus, and G. Kunkel. 2003. "Neurogene Mechanismen bei Asthma bronchiale." *Allergo Journal* 12 (1):61-66. doi: 10.1007/BF03361096.
- Hawrylowicz, C. M. 2005. "Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation." *J Exp Med* 202 (11):1459-63. doi: 10.1084/jem.20052211.
- Heinzerling, L., A. Mari, K. C. Bergmann, M. Bresciani, G. Burbach, U. Darsow, S. Durham, W. Fokkens, M. Gjomarkaj, T. Haahtela, A. T. Bom, S. Wohrl, H.

- Maibach, and R. Lockey. 2013. "The skin prick test - European standards." *Clin Transl Allergy* 3 (1):3. doi: 10.1186/2045-7022-3-3.
- Holtmeier, W., and D. Kabelitz. 2005. "γδ T Cells Link Innate and Adaptive Immune Responses." *Chem Immunol Allergy* 86:151-183. doi: 10.1159/000086659
- Horak, F. . 2016. Pädiatrische Allergologie – Was gibt es Neues? Abgerufen von <https://medonline.at/175897/2016/paediatrische-allergologie/> am 31.01.2022. *Clinicum Pneumo* 2/16.
- Jacobsen, L., B. Niggemann, S. Dreborg, H. A. Ferdousi, S. Halken, A. Host, A. Koivikko, L. A. Norberg, E. Valovirta, U. Wahn, and C. Moller. 2007. "Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study." *Allergy* 62 (8):943-8. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01451.x.
- James, L. K., M. H. Shamji, S. M. Walker, D. R. Wilson, P. A. Wachholz, J. N. Francis, M. R. Jacobson, I. Kimber, S. J. Till, and S. R. Durham. 2011. "Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies." *J Allergy Clin Immunol* 127 (2):509-516.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1080.
- Jiang, S., D. S. Game, D. Davies, G. Lombardi, and R. I. Lechler. 2005. "Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells?" *Eur J Immunol* 35 (4):1193-200. doi: 10.1002/eji.200425899.
- Juniper, E. F., A. K. Thompson, P. J. Ferrie, and J. N. Roberts. 2000. "Development and validation of the mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire." *Clin Exp Allergy* 30 (1):132-40. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00668.x.
- Juno, J. A., Y. Keynan, and K. R. Fowke. 2012a. "Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection." *PLoS Pathog* 8 (8):e1002838. doi: 10.1371/journal.ppat.1002838.
- Juno, J.A., Y. Keynan, and K. R. Fowke. 2012b. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection, Licensed under CC BY 2.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420949/> am 31.01.2022. . PLoS pathogens: Public Library of Science. doi: 10.1371/journal.ppat.1002838.
- Justiz Vaillant AA, Modi P, and Jan A. 2022 Jul 8. "Atopy." *In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–*:PMID: 31194344.
- Kabelitz, D. 2016. "Human gammadelta T cells: From a neglected lymphocyte population to cellular immunotherapy: A personal reflection of 30years of gammadelta T cell research." *Clin Immunol* 172:90-97. doi: 10.1016/j.clim.2016.07.012.
- Kabelitz, D., D. Wesch, and T. Hinz. 1999. "gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases." *Springer Semin Immunopathol* 21 (1):55-75. PMID: 10389232.
- Kabelitz, D., D. Wesch, E. Pitters, and M. Zoller. 2004. "Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo." *J Immunol* 173 (11):6767-76. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6767.

- Kaminsky, D A, S E Wenzel, C Carcano, D Gurka, D Feldsien, and C G Irvin. 1997. "Hyperpnea-induced changes in parenchymal lung mechanics in normal subjects and in asthmatics." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (4):1260-1266. doi: 10.1164/ajrccm.155.4.9105064.
- Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides." *Science* 278 (5343):1626-9. doi: 10.1126/science.278.5343.1626.
- Kim, C. H., B. Johnston, and E. C. Butcher. 2002. "Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V α 24+V β 11+ NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity." *Blood* 100 (1):11-16. doi: 10.1182/blood-2001-12-0196.
- Kinoshita, T., A. Baatjes, S. G. Smith, B. Dua, R. Watson, T. Kawayama, M. Larche, G. M. Gauvreau, and P. M. O'Byrne. 2014. "Natural regulatory T cells in isolated early responders compared with dual responders with allergic asthma." *J Allergy Clin Immunol* 133 (3):696-703. doi: 10.1016/j.jaci.2013.08.025.
- Kleiveland, C. R. 2015. "Peripheral Blood Mononuclear Cells." In *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, S. 161-167. Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_15.
- Klimek, L., C. Bachert, O. Pfaar, S. Becker, T. Bieber, R. Brehler, R. Buhl, I. Casper, A. Chaker, W. Czech, J. Fischer, Thomas Fuchs, M. Gerstlauer, K. Hörmann, T. Jakob, K. Jung, M. V. Kopp, V. Mahler, H. Merk, N. Mülleneisen, K. Nemat, U. Rabe, J. Ring, J. Saloga, W. Schlenker, C. Schmidt-Weber, H. Seyfarth, A. Sperl, T. Spindler, P. Staubach, S. Strieth, R. Treudler, C. Vogelberg, A. Wallrafen, W. Wehrmann, H. Wrede, T. Zuberbier, A. Bedbrook, G. W. Canonica, V. Cardona, T. B. Casale, W. Czarlewski, W. J. Fokkens, E. Hamelmann, P. W. Hellings, M. Jutel, D. Larenas-Linnemann, J. Mullol, N. G. Papadopoulos, S. Toppila-Salmi, T. Werfel, and J. Bousquet. 2019. "ARIA guideline 2019: treatment of allergic rhinitis in the German health system." *Allergo Journal International* 28 (7):255-276. doi: 10.1007/s40629-019-00110-9.
- Klimek, L., C. Vogelberg, and T. Werfel. 2019a. "Geleitwort/Vorwort." In *Weißbuch Allergie in Deutschland*, S. 9-14. Springer Medizin Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1007/978-3-89935-313-6>.
- Klimek, L., C. Vogelberg, and T. Werfel. 2019b. "Kapitel 1.3." In *Weißbuch Allergie in Deutschland*, S. 27-51. Springer Medizin Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1007/978-3-89935-313-6>.
- Klimek, L., C. Vogelberg, and T. Werfel. 2019c. "Kapitel 1.3." In *Weißbuch Allergie in Deutschland*, S.40, Tabelle 2. Springer Medizin Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1007/978-3-89935-313-6>.
- Kondo, M., J. Tamaoki, K. Takeyama, K. Isono, K. Kawatani, T. Izumo, and A. Nagai. 2006. "Elimination of IL-13 reverses established goblet cell metaplasia into ciliated epithelia in airway epithelial cell culture." *Allergol Int.* Sep 55 (3):329-36. doi: 10.2332/allergolint.55.329.
- Kovalszki, A., and P. F. Weller. 2016. "Eosinophilia." *Prim Care* 43 (4):607-617. doi: 10.1016/j.pop.2016.07.010.

- Kuylenstierna, C., N. K. Björkström, S. K. Andersson, P. Sahlström, L. Bosnjak, D. Paquin-Proulx, K.-J. Malmberg, H.-G. Ljunggren, M. Moll, and J. K. Sandberg. 2011. "NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d." *European journal of immunology* 41 (7):1913-1923. doi: 10.1002/eji.200940278.
- Lahn, M., A. Kanehiro, K. Takeda, A. Joetham, J. Schwarze, G. Kohler, R. O'Brien, E. W. Gelfand, and W. Born. 1999. "Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells." *Nat Med* 5 (10):1150-6. doi: 10.1038/13476.
- Lee, P. T., A. Putnam, K. Benlagha, L. Teyton, P. A. Gottlieb, and A. Bendelac. 2002. "Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis." *J Clin Invest* 110 (6):793-800. doi: 10.1172/jci15832.
- Lefrancois, L. 1991. "Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire?" *Immunol Today* 12 (12):436-8. doi: 10.1016/0167-5699(91)90015-l.
- Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr, and D. S. Robinson. 2004. "Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease." *Lancet* 363 (9409):608-15. doi: 10.1016/s0140-6736(04)15592-x.
- Lisbonne, M., S. Diem, A. de Castro Keller, J. Lefort, L. M. Araujo, P. Hachem, J. M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. Taniguchi, P. Van Endert, M. Dy, P. Askenase, M. Russo, B. B. Vargaftig, A. Herbelin, and M. C. Leite-de-Moraes. 2003. "Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model." *J Immunol* 171 (4):1637-41. doi: 10.4049/jimmunol.171.4.1637.
- Macglashan, D., Jr. 2005. "IgE and Fc{epsilon}RI regulation." *Ann N Y Acad Sci* 1050:73-88. doi: 10.1196/annals.1313.009.
- Mangan, B. A., M. R. Dunne, V. P. O'Reilly, P. J. Dunne, M. A. Exley, D. O'Shea, E. Scotet, A. E. Hogan, and D. G. Doherty. 2013. "Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells." *J Immunol* 191 (1):30-4. doi: 10.4049/jimmunol.1300121.
- Marshall, G. D., Jr. 2000. "Therapeutic options in allergic disease: antihistamines as systemic antiallergic agents." *J Allergy Clin Immunol* 106 (5 Suppl):S303-9. doi: 10.1067/mai.2000.110165.
- Meagher, L. C., J. M. Cousin, J. R. Seckl, and C. Haslett. 1996. "Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes." *J Immunol* 156 (11):4422-8. PMID: 8666816.
- Miller, M. R., J. Hankinson, V. Brusasco, F. Burgos, R. Casaburi, A. Coates, R. Crapo, P. Enright, C. P. van der Grinten, P. Gustafsson, R. Jensen, D. C. Johnson, N. MacIntyre, R. McKay, D. Navajas, O. F. Pedersen, R. Pellegrino, G. Viegi, and J. Wanger. 2005. "Standardisation of spirometry." *Eur Respir J* 26 (2):319-38. doi: 10.1183/09031936.05.00034805.
- Moore, W. C., A. T. Hastie, X. Li, H. Li, W. W. Busse, N. N. Jarjour, S. E. Wenzel, S. P. Peters, D. A. Meyers, and E. R. Bleeker. 2014. "Sputum neutrophil counts

- are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis." *J Allergy Clin Immunol* 133 (6):1557-63.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011.
- Mudde, G. C., R. Bheekha, and C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen. 1995. "Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy." *Immunology Today* 16 (8):380-383. doi: 10.1016/0167-5699(95)80005-0.
- Murdoch, J. R., L. G. Gregory, and C. M. Lloyd. 2014. "gammadeltaT cells regulate chronic airway inflammation and development of airway remodelling." *Clin Exp Allergy* 44 (11):1386-98. doi: 10.1111/cea.12395.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018a. "Kapitel 3.2.13." In *Janeway Immunologie*, S. 160-161. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018b. "Kapitel 4.3.10." In *Janeway Immunologie*, S.210-211. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018c. "Kapitel 6.3.5." In *Janeway Immunologie*, S. 313-315. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018d. "Kapitel 8.3.8." In *Janeway Immunologie*, S. 426-427. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018e. "Kapitel 9.2.3." In *Janeway Immunologie*, S. 475-476. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018f. "Kapitel 12.2.3." In *Janeway Immunologie*, S. 672. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018g. "Kapitel 14. ." In *Janeway Immunologie*, S. 783-825. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018h. "Kapitel 14.1.1." In *Janeway Immunologie*, S. 786-789. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018i. "Kapitel 14.2.6." In *Janeway Immunologie*, S. 807-809. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2018j. "Kapitel 14.2.8." In *Janeway Immunologie*, S. 811-814. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>.
- Nguyen, K. D., C. Vanichsarn, and K. C. Nadeau. 2008. "Increased cytotoxicity of CD4+ invariant NKT cells against CD4+CD25hiCD127lo/- regulatory T cells in allergic asthma." *Eur J Immunol* 38 (7):2034-45. doi: 10.1002/eji.200738082.
- Noon, L. 1911. "PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER." *The Lancet* 177 (4580):1572-1573. doi: 10.1016/S0140-6736(00)78276-6.
- O'Reilly, V., S. G. Zeng, G. Bricard, A. Atzberger, A. E. Hogan, J. Jackson, C. Feighery, S. A. Porcelli, and D. G. Doherty. 2011. "Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha-invariant natural killer T cells." *PLoS One* 6 (12):e28648. doi: 10.1371/journal.pone.0028648.
- Orlando Guntinas-Lichius, Jens Klußmann, Stephan Lang. 2021. 33.1 Allergische Rhinitis In *Referenz HNO-Heilkunde*, edited by O. Guntias-Lichius. New York: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- Pang, D. J., J. F. Neves, N. Sumaria, and D. J. Pennington. 2012. "Understanding the complexity of gammadelta T-cell subsets in mouse and human." *Immunology* 136 (3):283-90. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03582.x.

- Papotto, P. H., J. C. Ribot, and B. Silva-Santos. 2017. "IL-17(+) gammadelta T cells as kick-starters of inflammation." *Nat Immunol* 18 (6):604-611. doi: 10.1038/ni.3726.
- Pawankar, R. 2000. "gammadelta T cells in allergic airway diseases." *Clin Exp Allergy* 30 (3):318-23. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00727.x.
- Pawankar, R. U., M. Okuda, K. Suzuki, K. Okumura, and C. Ra. 1996. "Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal gamma delta T cells in allergic and infectious rhinitis." *Am J Respir Crit Care Med* 153 (5):1655-65. doi: 10.1164/ajrccm.153.5.8630617.
- Pedersen, F., U. M. Zissler, H. Watz, K. F. Rabe, J. M. Hohlfeld, and O. Holz. 2019. "Rating sputum cell quality in clinical trials for asthma and COPD treatment." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* (14):195-198. doi: 10.2147/COPD.S188033
- Peterman, G. M., C. Spencer, A. I. Sperling, and J. A. Bluestone. 1993. "Role of gamma delta T cells in murine collagen-induced arthritis." *J Immunol* 151 (11):6546-58. PMID: 8245484.
- Pietschmann, K., S. Beetz, S. Welte, I. Martens, J. Gruen, H. H. Oberg, D. Wesch, and D. Kabelitz. 2009. "Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes." *Scand J Immunol* 70 (3):245-55. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02290.x.
- Pite, H., A. M. Pereira, M. Morais-Almeida, C. Nunes, J. Bousquet, and J. A. Fonseca. 2014. "Prevalence of asthma and its association with rhinitis in the elderly." *Respir Med* 108 (8):1117-26. doi: 10.1016/j.rmed.2014.05.002.
- Pizzichini, E., M. M. Pizzichini, R. Leigh, R. Djukanovic, and P. J. Sterk. 2002. "Safety of sputum induction." *Eur Respir J Suppl* 37:9-18. doi: 10.1183/09031936.02.00000902
- Prussin, C., and D. D. Metcalfe. 2003. "4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." *J Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl):486-94. doi: 10.1067/mai.2003.120.
- Raulf, M., V. Liebers, C. Steppert, and X. Baur. 1994. "Increased gamma/delta-positive T-cells in blood and bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis." *Eur Respir J* 7 (1):140-7. doi: 10.1183/09031936.94.07010140.
- Ribot, J. C., A. deBarros, D. J. Pang, J. F. Neves, V. Peperzak, S. J. Roberts, M. Girardi, J. Borst, A. C. Hayday, D. J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2009. "CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets." *Nat Immunol* 10 (4):427-36. doi: 10.1038/ni.1717.
- Roberts, S. D., M. O. Farber, K. S. Knox, G. S. Phillips, N. Y. Bhatt, J. G. Mastronarde, and K. L. Wood. 2006. "FEV1/FVC ratio of 70% misclassifies patients with obstruction at the extremes of age." *Chest* 130 (1):200-6. doi: 10.1378/chest.130.1.200.
- Robinson, D., Q. Hamid, S. Ying, A. Bentley, B. Assoufi, S. Durham, and A. B. Kay. 1993. "Prednisolone treatment in asthma is associated with modulation of bronchoalveolar lavage cell interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma cytokine gene expression." *Am Rev Respir Dis* 148 (2):401-6. doi: 10.1164/ajrccm/148.2.401.

- Rossjohn, J., D. G. Pellicci, O. Patel, L. Gapin, and D. I. Godfrey. 2012. "Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells." *Nat Rev Immunol* 12 (12):845-57. doi: 10.1038/nri3328.
- Rouhos, A., A. Kainu, J. Karjalainen, A. Lindqvist, P. Piirilä, S. Sarna, T. Haahtela, and A. R. A. Sovijärvi. 2008. "Atopic sensitization to common allergens without symptoms or signs of airway disorders does not increase exhaled nitric oxide." *The clinical respiratory journal* 2 (3):141-148. doi: 10.1111/j.1752-699X.2007.00045.x.
- Russano, A. M., E. Agea, L. Corazzi, A. D. Postle, G. De Libero, S. Porcelli, F. M. de Benedictis, and F. Spinozzi. 2006. "Recognition of pollen-derived phosphatidyl-ethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells." *J Allergy Clin Immunol* 117 (5):1178-84. doi: 10.1016/j.jaci.2006.01.001.
- S2k-Leitlinie-DGAKI. 2014. "S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) ; Leitlinie zur (allergen-) spezifischen Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen 2014." Abgerufen von www.dgaki.de/wp-content/uploads/2014/12/Leitlinie_SIT_Pfaar-dtsch_12-2014.pdf am 01.04.2020.
- Sade, K., S. Kivity, A. Levy, and E. Fireman. 2003. "The effect of specific immunotherapy on T-cell receptor repertoire in patients with allergy to house-dust mite." *Allergy* 58 (5):430-4. doi: 10.1034/j.1398-9995.2003.00055.x.
- Sakae, T. M., R. Maurici, D. J. Trevisol, M. M. Pizzichini, and E. Pizzichini. 2014. "Effects of prednisone on eosinophilic bronchitis in asthma: a systematic review and meta-analysis." *J Bras Pneumol* 40 (5):552-63. doi: 10.1590/s1806-37132014000500012.
- Sakula, A. 1985. "Henry Hyde Salter (1823-71): a biographical sketch." *Thorax* 40 (12):887-8. doi: 10.1136/thx.40.12.887.
- Salter, H.H. 1860. "Kapitel 1." In *On Asthma: Its Pathology and Treatment*, S.17. London: John Churchill. ISBN: 978-1148389264.
- Santegoets, S. J., E. M. Dijkgraaf, A. Battaglia, P. Beckhove, C. M. Britten, A. Gallimore, A. Godkin, C. Gouttefangeas, T. D. de Gruijl, H. J. Koenen, A. Scheffold, E. M. Shevach, J. Staats, K. Tasken, T. L. Whiteside, J. R. Kroep, M. J. Welters, and S. H. van der Burg. 2015. "Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry." *Cancer Immunol Immunother* 64 (10):1271-86. doi: 10.1007/s00262-015-1729-x.
- Schlaud, M., K. Atzpodien, and W. Thierfelder. 2007. "Allergische Erkrankungen-Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS)." *Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung*. 50. doi: 10.1007/s00103-007-0231-9.
- Sedgwick, J. B., and W. W. Busse. 1997. "Inhibitory effect of cetirizine on cytokine-enhanced in vitro eosinophil survival." *Ann Allergy Asthma Immunol* 78 (6):581-5. doi: 10.1016/s1081-1206(10)63219-x.
- Shifren, A., C. Witt, C. Christie, M. Castro, and T. S. Hallstrand. 2012. "Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways." *Journal of Allergy* 2012:316049. doi: 10.1155/2012/316049.

- Siegers, G. M. 2018. "Integral Roles for Integrins in gammadelta T Cell Function." *Front Immunol* 9:521. doi: 10.3389/fimmu.2018.00521.
- Siegers, G. M., T. C. Felizardo, A. M. Mathieson, Y. Kosaka, X. H. Wang, J. A. Medin, and A. Keating. 2011. "Anti-leukemia activity of in vitro-expanded human gamma delta T cells in a xenogeneic Ph+ leukemia model." *PLoS One* 6 (2):e16700. doi: 10.1371/journal.pone.0016700.
- Smurthwaite, L., S. N. Walker, D. R. Wilson, D. S. Birch, T. G. Merrett, S. R. Durham, and H. J. Gould. 2001. "Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients." *European Journal of Immunology* 31 (12):3422-3431. doi: 10.1002/1521-4141(200112)31:12<3422::aid-immu3422>3.0.co;2-t
- Solutions, Statistic. 2022. "Correlation (Pearson, Kendall, Spearman)." Abgerufen von <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/correlation-pearson-kendall-spearman/> am 03.02.2022.
- Spergel, J. M., and A. S. Paller. 2003. "Atopic dermatitis and the atopic march." *J Allergy Clin Immunol* 112 (6 Suppl):S118-27. doi: 10.1016/j.jaci.2003.09.033.
- Spinozzi, F., E. Agea, O. Bistoni, N. Forenza, A. Monaco, G. Bassotti, I. Nicoletti, C. Riccardi, F. Grignani, and A. Bertotto. 1996. "Increased allergen-specific, steroid-sensitive gamma delta T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma." *Ann Intern Med* 124 (2):223-7. doi: 10.7326/0003-4819-124-2-199601150-00005.
- Thamm, R., C. Poethko-Müller, A. Hüther, and M. Thamm. 2018. "Allergische Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. ." *Journal of Health Monitoring* 3 (3):03–18. doi: 10.17886/RKI-GBE-2018-075.
- Thomas, S. Y., Y. H. Chyung, and A. D. Luster. 2010. "Natural killer T cells are not the predominant T cell in asthma and likely modulate, not cause, asthma." *J Allergy Clin Immunol* 125 (5):980-4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.01.032.
- Totsch, M., J. Guzman, D. Theegarten, K. W. Schmid, and U. Costabel. 2007. "[Bronchoalveolar lavage]." *Pathologe* 28 (5):346-53. doi: 10.1007/s00292-007-0926-6.
- Trautmann, A., and J. Kleine-Tebbe. 2017a. "Kapitel 6.1/6.2." In *Allergologie in Klinik und Praxis*, S. 54-60. Georg Thieme Verlag KG. doi: 10.1055/b-004-140676.
- Trautmann, A., and J. Kleine-Tebbe. 2017b. "Kapitel 12.1/12.2." In *Allergologie in Klinik und Praxis*, S. 126-130. Georg Thieme Verlag KG. doi: 10.1055/b-004-140676.
- Trautmann, A., and J. Kleine-Tebbe. 2017c. "Kapitel 12.3." In *Allergologie in Klinik und Praxis*, S. 147-154. Georg Thieme Verlag KG. doi: 10.1055/b-004-140676.
- Urban, E. M., H. Li, C. Armstrong, C. Focaccetti, C. Cairo, and C. D. Pauza. 2009. "Control of CD56 expression and tumor cell cytotoxicity in human Vgamma2Vdelta2 T cells." *BMC Immunol* 10:50. doi: 10.1186/1471-2172-10-50.
- Urboniene, D., A. Babusyte, J. Lotvall, R. Sakalauskas, and B. Sitkauskiene. 2013. "Distribution of gammadelta and other T-lymphocyte subsets in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma." *Respir Med* 107 (3):413-23. doi: 10.1016/j.rmed.2012.11.012.

- Van Acker, H. H., S. Anguille, Y. Willemen, J. M. Van den Bergh, Z. N. Berneman, E. Lion, E. L. Smits, and V. F. Van Tendeloo. 2016. "Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells." *J Hematol Oncol* 9 (1):101. doi: 10.1186/s13045-016-0329-3.
- van der Heijden, F. L., R. J. van Neerven, and M. L. Kapsenberg. 1995. "Relationship between facilitated allergen presentation and the presence of allergen-specific IgE in serum of atopic patients." *Clin Exp Immunol* 99 (2):289-93. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb05547.x.
- Van Kaer, L., V. V. Parekh, and L. Wu. 2011. "Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity." *Cell Tissue Res* 343 (1):43-55. doi: 10.1007/s00441-010-1023-3.
- van Neerven, R. J., T. Wikborg, G. Lund, B. Jacobsen, A. Brinch-Nielsen, J. Arnved, and H. Ipsen. 1999. "Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation." *J Immunol* 163 (5):2944-52. PMID: 10453043.
- Vignola, A. M., L. Crampette, M. Mondain, G. Sauvere, W. Czarlewski, J. Bousquet, and A. M. Campbell. 1995. "Inhibitory activity of loratadine and descarboethoxyloratadine on expression of ICAM-1 and HLA-DR by nasal epithelial cells." *Allergy* 50 (3):200-3. doi: 10.1111/j.1398-9995.1995.tb01133.x
- Visco, V., C. Dolecek, S. Denépoux, J. Le Mao, C. Guret, F. Rousset, M. T. Guinnepain, D. Kraft, R. Valenta, A. Weyer, J. Banchereau, and S. Labecque. 1996. "Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1." *J Immunol* 157 (2):956-62.
- Wang, Q., Q. Sun, Q. Chen, H. Li, and D. Liu. 2020. "Expression of CD27 and CD28 on $\gamma\delta$ T cells from the peripheral blood of patients with allergic rhinitis." *Experimental and therapeutic medicine* 20 (6):224-224. doi: 10.3892/etm.2020.9354.
- Wang, Y. H., and Y. J. Liu. 2008. "The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation." *Curr Opin Immunol* 20 (6):697-702. doi: 10.1016/j.coi.2008.09.004.
- Werchan, M., B. Werchan, and K.-C. Bergmann. 2018. "Deutscher Pollenflugkalender 4.0 — Update mit Messdaten von 2011 bis 2016." *Allergo Journal* 27 (3):18-20. doi: 10.1007/s15007-018-1578-y.
- Wilcock, L. K., J. N. Francis, and S. R. Durham. 2006. "IgE-Facilitated Antigen Presentation: Role in Allergy and the Influence of Allergen Immunotherapy." *Immunology and Allergy Clinics* 26 (2):333-347. doi: 10.1016/j.iac.2006.02.004.
- Willcox, C. R., V. Pitard, S. Netzer, L. Couzi, M. Salim, T. Silberzahn, J. F. Moreau, A. C. Hayday, B. E. Willcox, and J. Dechanet-Merville. 2012. "Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor." *Nat Immunol* 13 (9):872-9. doi: 10.1038/ni.2394.
- WMA. 2013. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. WMA General Assembly. Abgerufen von

<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/> am 01.12.2021.

- Wrobel, P., H. Shojaei, B. Schittek, F. Gieseler, B. Wollenberg, H. Kalthoff, D. Kabelitz, and D. Wesch. 2007. "Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition." *Scand J Immunol* 66 (2-3):320-8. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01963.x.
- Wu, P., S. Mitchell, and G. M. Walsh. 2005. "A new antihistamine levocetirizine inhibits eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 under flow conditions." *Clin Exp Allergy* 35 (8):1073-9. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02290.x.
- Wu, Y. L., Y. P. Ding, Y. Tanaka, L. W. Shen, C. H. Wei, N. Minato, and W. Zhang. 2014. "gammadelta T cells and their potential for immunotherapy." *Int J Biol Sci* 10 (2):119-35. doi: 10.7150/ijbs.7823.
- Wu, Y., W. Wu, W. M. Wong, E. Ward, A. J. Thrasher, D. Goldblatt, M. Osman, P. Digard, D. H. Canaday, and K. Gustafsson. 2009. "Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis." *J Immunol* 183 (9):5622-9. doi: 10.4049/jimmunol.0901772.
- Wurtzen, P. A., G. Lund, K. Lund, M. Arvidsson, S. Rak, and H. Ipsen. 2008. "A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation." *Clin Exp Allergy* 38 (8):1290-301. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03020.x.
- Yan-ming, L., C. Lan-fang, L. Chen, L. Ya-qin, C. Wei, and Z. Wen-ming. 2012. "The effect of specific immunotherapy on natural killer T cells in peripheral blood of house dust mite-sensitized children with asthma." *Clin Dev Immunol* 2012:148262. doi: 10.1155/2012/148262.
- Zheng, J., Y. Liu, Y. L. Lau, and W. Tu. 2013. "gammadelta-T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity." *Cell Mol Immunol* 10 (1):50-7. doi: 10.1038/cmi.2012.43.
- Zheng, R., and Q. Yang. 2014. "The role of the gamma delta T cell in allergic diseases." *J Immunol Res* 2014:963484. doi: 10.1155/2014/963484.
- Zielinska, K. A., L. Van Moortel, G. Opdenakker, K. De Bosscher, and P. E. Van den Steen. 2016. "Endothelial Response to Glucocorticoids in Inflammatory Diseases." *Front Immunol* 7:592. doi: 10.3389/fimmu.2016.00592.
- Zissler, U. M. 2012. "Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum." Dissertation (Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main).
- Zissler, U. M., M. Ulrich, C. A. Jakwerth, S. Rothkirch, F. Guerth, M. Weckmann, M. Schiemann, B. Haller, C. B. Schmidt-Weber, and A. M. Chaker. 2018. "Biomatrix for upper and lower airway biomarkers in patients with allergic asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142 (6):1980-1983. doi: 10.1016/j.jaci.2018.07.027.
- Zuberbier, T., J. Lotvall, S. Simoons, S. V. Subramanian, and M. K. Church. 2014. "Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA(2) LEN review." *Allergy* 69 (10):1275-9. doi: 10.1111/all.12470.

