

Fakultät für Medizin, Zentrum Allergie und Umwelt der TU München /Klinik und Poliklinik
für Hals-Nasen-, und Ohrenheilkunde der TU München am Klinikum rechts der Isar

Bronchiales Sputumtranskriptom bei Allergischer Rhinitis und Asthma

Larissa Stella Lewitan

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber
2. apl. Prof. Dr. Ulf Darsow

Die Dissertation wurde am 09.01.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2019 angenommen.

Technische Universität München

Bronchiales Sputumtranskriptom

bei Allergischer Rhinitis und Asthma

**Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Technischen Universität München**

vorgelegt von Larissa Lewitan

München, 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen	1
1.2 Charakterisierung und Pathophysiologie Allergische Rhinitis und Asthma.....	2
1.3 Diagnostik und Therapie.....	5
1.4 Die Suche nach Biomarkern und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	8
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Geräte	12
2.2 Probandenkollektiv	12
2.3 Induktion von Sputum.....	14
2.3.1 Geräte und Materialien.....	14
2.3.2 Ablauf der Sputum-Induktion.....	14
2.4 Weitere Untersuchungen.....	16
2.4.1 Geräte und Materialien.....	16
2.4.2 Ablauf der Untersuchungen.....	17
2.5 Aufbereitung des Sputums.....	18
2.5.1 RNA-Isolation.....	20
2.5.2 Microarrays	21
2.5.3 Real-time qPCR.....	22
2.5.4 Expression auf Proteinebene	24
2.6 Datenanalyse und statistische Auswertung.....	24
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Demographische Daten.....	26
3.2 Klinische Daten	27

3.2.1	Lungenfunktion	28
3.2.2	Zelldifferenzierung und Korrelation zu klinischen Daten.....	30
3.2.3	RQLQ und PSQ.....	30
3.3	Transkriptomanalyse (Microarray)	31
3.3.1	Allergiker vs. gesunde Kontrollen.....	33
3.3.2	Allergiker mit vs. ohne Asthma	37
3.3.3	Allergiker mit vs. ohne SCIT.....	39
3.3.4	Transkriptionsfaktoren	43
3.4	qPCR- Validierung.....	48
3.5	Messung der Proteinspiegel.....	49
4	Diskussion	52
4.1	Diskussion der Ergebnisse der klinischen Daten	52
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Transkriptomanalyse	53
4.2.1	Allergiker vs. gesunde Kontrollen.....	53
4.2.2	Allergiker mit vs. ohne Asthma	62
4.2.3	Allergiker mit vs. ohne SCIT.....	65
4.2.4	Expression der Transkriptionsfaktoren.....	72
4.3	Diskussion der Ergebnisse der qPCR-Validierung	75
4.4	Diskussion der Ergebnisse der Proteinspiegel-Messung	76
4.5	Methodik und Studiendesign	77
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Anhang	92
7.1	Protokoll für Sputuminduktion.....	92
7.2	Mini-RQLQ.....	93
7.3	PSQ	94
7.4	Kongressbeiträge	95
8	Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

AA = allergisches Asthma

ADAMTS = A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs

AIT = allergen immunotherapy

APC = Antigen-präsentierende Zellen

AR = Allergische Rhinitis/Androgen-Rezeptor

BMI = body mass index

CAP = carrier polymer system

CCL = CC-chemokine ligand

CCR1 = C-C chemokine receptor type 1

CD4 = cluster of differentiation 4

CLCA1 = Calcium-activated chloride-channel regulator 1

COPD = chronic obstructive pulmonary disease

CSF = colony stimulating factor

CXCL = C-X-C chemokine ligand

DC = Dendritic cell

DNA = Desoxyribonucleic acid

EBC = exhaled breath condensate

ECP = eosinophilic cationic protein

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

FACS = fluorescence activated cell sorting

FASLG = Fas- Ligand

FC = fold change

FEV1 = Forced Expiratory Pressure in 1 Second = Einsekundenkapazität

FoxP3 = Forkhead-Box-Protein P3

FVC = forcierte Vitalkapazität

GAPDH = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GATA3 = GATA Binding Protein 3

GINA-Score = Global Strategy for Asthma Management and Prevention-Score

GO = gene ontology

ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule 1

IFN- γ = Interferon γ

IgE = Immunglobulin E

IL (-4) = Interleukin (-4)

ILC = innate lymphoid cell

INH1 = Inhibin subunit alpha

MEF 75/50/25 = mean expiratory flow = mittlere Atemstromstärke, wenn noch 75 %/50 %/25 % der Vitalkapazität in der Lunge sind

MHCII = Major histocompatibility complex class II

MMP-9 = Matrix-Metalloproteinase 9

mRNA = messenger RNA

NaCl = Natriumchlorid

NFkB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NK = natürliche Killerzellen

PBMC = peripheral blood mononuclear cell = Monozyten, Lymphozyten

PBS = phosphate buffered saline

PCR = Polymerase Chain Reaction

PPARG = Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

POSTN = Periostin

PSQ = perceived stress questionnaire

RAST = Radio-Allergo-Sorbent-Test

RIN = RNA Integrity Number

RNA = ribonucleid acid

rpm = revolutions per minute

RQLQ = Rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire

SCGB1A1 = Secretoglobin Family 1A Member 1

SCIT = subcutane Immuntherapie

SERPIN = serine protease inhibitor

SLIT = sublinguale Immuntherapie

STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription

TCF7 = transcription factor 7

TFE3 = transcription factor E3

TFRC = transferrin receptor

TGFβ = Transforming growth factor β

TH2 = T-Helfer-Zelle Typ 2

TNF = Tumornekrosefaktor

TNFSF 14 = Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14

Treg = regulatorische T-Zelle

TSLP = Thymic stromal lymphopoietin

VC = Vitalkapazität

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Mechanismen bei akutem und chronischem Asthma	2
Abbildung 2: Wirkmechanismen der Treg-Zellen	7
Abbildung 3: Übersicht über das Probandenkollektiv	13
Abbildung 4: Workflow für Sputuminduktion	16
Abbildung 5: Übersicht Probandenkollektiv – Auswahl für Transkriptomanalyse.....	21
Abbildung 6: Geschlechterverteilung im Gesamtkollektiv	26
Abbildung 7: Altersverteilung im Gesamtkollektiv	26
Abbildung 8: Gesamt-IgE Allergiker vs. Kontrollen.....	27
Abbildung 9: GINA-Score in vs. außerhalb der Pollensaison bei Asthmatikern	27
Abbildung 10: Tiffeneau-Index Asthmatischer vs. Nicht-Asthmatischer in der Pollensaison	29
Abbildung 11: MEF25% Asthmatischer vs. Nicht-Asthmatischer in der Pollensaison	29
Abbildung 12: MEF50% Asthmatischer vs. Nicht-Asthmatischer in der Pollensaison	29
Abbildung 13: FEV1% Asthmatischer vs. Nicht-Asthmatischer außerhalb der Pollensaison.....	29
Abbildung 14: RQLQ-Gesamtscore Allergiker vs. Kontrollen.....	31
Abbildung 15: RQLQ-Gesamtscore in vs. außerhalb der Pollensaison bei Allergikern	31
Abbildung 16: RQLQ-Gesamtscore in der Pollensaison bei Allergikern mit vs. ohne SCIT	31
Abbildung 17: Volcano Plot für die Gegenüberstellung der Transkriptomane von Probanden mit allergischer Rhinitis vs. gesunde Kontrollen	33
Abbildung 18: Gegenüberstellung der Transkriptomane der Allergiker (mit und ohne Asthma; ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)	34
Abbildung 19: Gegenüberstellung der Transkriptomane der Allergiker ohne Asthma (ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)	36
Abbildung 20: Gegenüberstellung der Transkriptomane der Allergiker mit vs. ohne Asthma (jeweils ohne SCIT) in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b).....	38
Abbildung 21: Gegenüberstellung der Transkriptomane der Allergiker (mit und ohne Asthma) mit SCIT vs. ohne SCIT in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)	40
Abbildung 22: Gegenüberstellung der Transkriptomane der allergischen Asthmatischer mit vs. ohne SCIT in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)	42
Abbildung 23: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern (mit und ohne Asthma, ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b).....	43
Abbildung 24 Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern ohne Asthma (ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)	44
Abbildung 25: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern mit vs. ohne Asthma in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)	45
Abbildung 26: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern (mit und ohne Asthma) mit vs. ohne SCIT in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b).....	46
Abbildung 27: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von allergischen Asthmatischer mit vs. ohne SCIT in (a) bzw. außerhalb (b) der Pollensaison	47

Abbildung 28: qPCR SCGB1A, IL24 in der Pollensaison.....	48
Abbildung 29: qPCR SCGB1A, IL24 außerhalb der Pollensaison	49
Abbildung 30: Mesoscale-Messung CCL26.....	49
Abbildung 31: Mesoscale-Messung IL-5	49
Abbildung 32: Mesoscale-Messung IL-8	50
Abbildung 33: inverse Korrelation zwischen SCGB1A1 und CCL26 bzw. IL-5	50
Abbildung 34: Korrelationen zwischen IL-24 bzw. SCGB1A1 und RQLQ	51
Abbildung 35: Pollenflugbelastung Birke und Gräser in Bayern 2014 (zum Zeitpunkt der in-season-Visite)	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	12
Tabelle 2: Geschlechterverteilung	26
Tabelle 3: Altersverteilung	26
Tabelle 4: Sensibilisierungen im Probandenkollektiv	27
Tabelle 5: Charakterisierung des Probandenkollektivs in („in season“⁴) bzw. außerhalb der Pollensaison („out of season“⁴)	28
Tabelle 6: Zelldifferenzierung im Sputum	30

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

Die Atopie, also die Disposition des Körpers zur Überempfindlichkeit und erhöhten Neigung zur Typ I-Sensibilisierbarkeit durch Allergene, kann sich in vielen Formen äußern.

Zum atopischen Formenkreis werden traditionell die allergische Rhinitis/Conjunktivitis, das allergische Asthma, das atopische Ekzem und die Nahrungsmittelallergien gezählt. Um zwei der häufigsten Erscheinungsformen – allergische Rhinitis und allergisches Asthma bronchiale – wird es im Folgenden gehen.

Diese können mittlerweile mit Fug und Recht als Volkskrankheit bezeichnet werden: Die Lebenszeitprävalenz für allergische Erkrankungen insgesamt liegt in Deutschland der aktuellen Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland DEGS1 (2008-2011) zufolge bei etwa 30 % (Langen et al., 2013). Die meist verbreitete Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis ist mit aktuell weltweit mehr als 500 Mio. betroffenen Patienten (Bousquet et al., 2008) und einer (steigenden) Prävalenz von derzeit über 20 % in Europa (Bauchau & Durham, 2004) die allergische Rhinitis.

Menschen aller Altersstufen können betroffen sein. Die Beeinträchtigung der Lebensqualität und Leistungsfähigkeit sind erheblich (Elkholy et al., 2012). So kann Asthma bzw. allergische Rhinitis gerade bei betroffenen Kindern und Jugendlichen zu einem gestörten Nachtschlaf mit Tagesmüdigkeit, Unkonzentriertheit oder gar Fehltagen und in der Folge oftmals abfallenden schulischen Leistungen führen. Auch die soziale Interaktion kann beeinträchtigt werden. Nicht zu vergessen sind mögliche Nebeneffekte der Therapie (Mir et al., 2012). Darüber hinaus sind auch die ökonomischen Auswirkungen nicht zu unterschätzen (Schoenwetter et al., 2004).

Die häufigsten Sensibilisierungen gegen Aeroallergene sind in Deutschland die auf Lieschgras- und Birkenpollen (Haftenberger et al., 2013), welche auch in der vorliegenden Studie als Einschlusskriterien verwendet und genauer untersucht wurden.

1.2 Charakterisierung und Pathophysiologie Allergische Rhinitis und Asthma

Unter Allergie versteht man eine spezifische, überschießende Reaktion des Immunsystems gegen Fremdstoffe (= Allergene), die eigentlich nicht pathogen sind und daher keine derartige Immunreaktion erfordern würden.

Pathophysiologisch handelt es sich bei der Allergischen Rhinitis um eine durch bestimmte Allergene ausgelöste und über Typ I Reaktion (IgE-) vermittelte Entzündung der Nasen- und oft auch der Conjunktivalschleimhaut (allergische Rhinoconjunktivitis). Die Typ I-Reaktion ist die bei weitem häufigste Form der von Coombs & Gell unterschiedenen Formen der allergischen Reaktion und wird auch als Soforttyp bezeichnet. Nach einem (symptomlosen) Erstkontakt mit dem Allergen und Präsentation durch Antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Dendritische Zellen) via MHCII bilden TH2-Lymphozyten u. a. IL-4 und IL-13, welche B-Lymphozyten zur Ausreifung zu Plasmazellen und zur Bildung spezifischer IgEs stimulieren (vgl. Abbildung 1). Diese binden in der Folge an Mastzellen und vermitteln bei erneutem Allergenkontakt in der Frühphase der allergischen Reaktion deren Degranulation mit Freisetzung von Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen. Diese vermitteln die typischen Symptome der Allergie: Die Betroffenen leiden im Falle der allergischen Rhinoconjunctivitis typischerweise unter juckender Nase mit verstärkter Sekretion, Niesen, Behinderung der Nasenatmung, juckenden und oftmals auch geröteten Augen mit evtl. Fremdkörpergefühl sowie beeinträchtigtem Allgemeinbefinden.

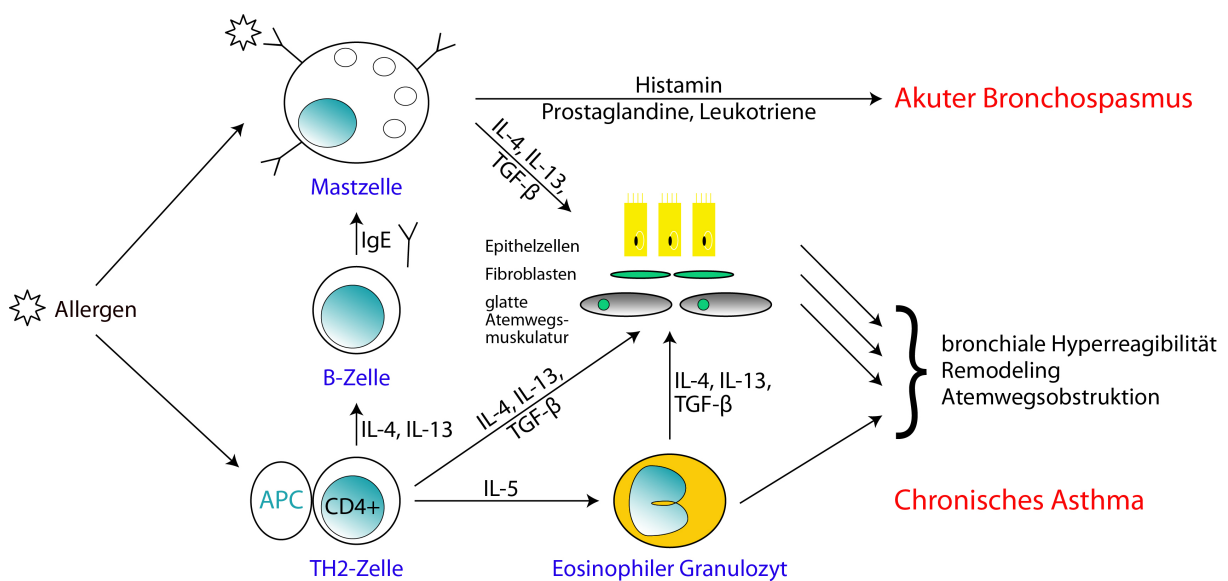


Abbildung 1: Pathophysiologische Mechanismen bei akutem und chronischem Asthma
modifiziert nach (Larache et al., 2003)

Weiter unten im Atemwegstrakt äußert sich die Allergie in Form von allergischem Asthma. Asthma bronchiale bezeichnet eine heterogene Gruppe von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen mit den gemeinsamen Charakteristika Atemwegsentzündung, -obstruktion und bronchiale Hyperreagibilität. Vom allergischen/atopischen, meist bereits im Kindesalter beginnenden Asthma kann das sogenannte intrinsische, z. B. medikamentös, chemisch-toxisch oder infektiös ausgelöste Asthma unterschieden werden. Das allergische Asthma ist, ähnlich wie die allergische Rhinoconjunctivitis, durch eine IgE-vermittelte allergische Reaktion vom Soforttyp mit Mastzelldegranulation und Histaminfreisetzung nach vorangegangener Sensibilisierungsphase gekennzeichnet. Sowohl auf struktureller als auch auf funktioneller Ebene gibt es zahlreiche Verbindungen zwischen der nasalen und bronchialen Schleimhaut. Asthma und allergische Rhinitis sind so eng miteinander verknüpft, dass teilweise nur mehr von einer Erkrankung (allergische Rhinobronchitis oder „united airways disease“) gesprochen wird (Passalacqua et al., 2000). Zwischen den beiden Erkrankungsformen besteht eine hohe Komborbidität: 80 % der Asthmatiker haben auch eine allergische Rhinitis. Umgekehrt leiden etwa 20-40 % der Patienten mit allergischer Rhinitis zudem unter Asthma bronchiale (Bousquet et al., 2008). Allergische Rhinitis erhöht das Risiko für Asthma und Asthma das Risiko für allergische Rhinitis. Interessanterweise lässt sich bei Patienten mit allergischer Rhinitis ohne jegliche Asthma-Symptome eine bronchiale Hyperreagibilität nachweisen (Valdesoiro et al., 2004), was als Indiz einer subklinisch vorhandenen Entzündungsaktivität in den unteren Atemwegen auch bei Nicht-Asthmatikern gedeutet werden kann. Dafür sprechen auch die Ergebnisse zahlreicher Studien, die in Bronchialbiopsien, bronchoalveolärer Lavage oder Sputum bei Patienten mit allergischer Rhinitis Entzündungsaktivität nachweisen konnten (Compalati et al., 2010).

Eine zentrale Rolle spielen die TH2-Zellen, die über ihre Zytokine IL-4, -5 und -13 einen großen Teil der zu beobachtenden pathophysiologischen Vorgänge vermitteln. Via IL-5 werden eosinophile Granulozyten aus dem Knochenmark mobilisiert, sodass sie typischerweise in erhöhter Anzahl am Ort des allergischen Geschehens nachweisbar sind. Den Eosinophilen wird mit ihren Atemwegsepithel-schädigenden Mediatoren eine tragende Rolle bei der Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität zugeschrieben (Jacoby et al., 2001).

Auch in der Aufrechterhaltung bzw. Chronifizierung des Asthmas nehmen TH2-Zellen eine wichtige Rolle ein (Larche et al., 2003). So wirken sie neben den Eosinophilen und Mastzellen via IL-4, IL-13 und TGF β auf Fibroblasten, Epithelzellen und die glatte Atemwegsmuskulatur ein, was die (langfristige) Atemwegsobstruktion, -hyperreagibilität und den fehlerhaften Umbau, das sogenannte Remodeling, der Atemwege zur Folge hat. Auf

histologischer Ebene betrachtet kommt es dabei zur Hyperplasie der glatten Muskelzellen, subepithelialer Fibrose und Becherzell-Hyperplasie (vgl. Abbildung 1).

Eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Funktionen der TH2-Zytokine findet sich im Abschnitt „Diskussion“.

Leitsymptom der betroffenen Patienten ist die anfallsartig auftretende Dyspnoe, oft mit expiratorischem Stridor, typischerweise nachts verstärkt, sowie oftmals trockener, chronischer Husten. Als vital bedrohliche Komplikation kann es zum Status asthmaticus kommen.

Die sogenannten Tregs, T-regulatorische Zellen, hingegen, sind eine Subpopulation der T-Lymphozyten, die immunmodulierend bzw. –suppressiv durch Hemmung der Induktion und Proliferation von T-Effektor-Zellen (TH1, TH2) wirken. Als Treg-typische Marker gelten der Transkriptionsfaktor FOXP3 und das Zytokin TGF β , das eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von naiven CD4+ Zellen zu Tregs innezuhaben scheint (Chen, 2011).

Es gibt konstitutionelle sowie induzierbare Tregs, was man sich etwa bei der Wirkung der spezifischen Immuntherapie zunutze macht.

Je nach jeweiligem Antigen und je nach Mikromilieu, das maßgeblich von Zytokinen geprägt wird, erfolgt im Zellkern der naiven T-Zelle mithilfe Aktivierung entsprechender Transkriptionsfaktoren die Differenzierung zu TH1-, TH2- oder Treg-Zellen.

Mittlerweile ist bekannt, dass bei der Entstehung von Allergien eine Dysbalance der T-Zell-Subgruppen zugrunde liegt: So formuliert die Hygienehypothese die Vermutung, dass durch geringe mikrobielle Exposition im Kindesalter das TH1-Reaktionsmuster nicht ausreichend vom Immunsystem erlernt wird, was in der Folge eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zur TH2-Antwort nach sich zieht. Dies sei der Grund, warum der Organismus später auf harmlose Allergene mit einer überschießenden TH2-Immunantwort reagiert.

Jedoch wird diese Hypothese allein einer heterogenen und komplexen Erkrankung wie Asthma nicht gerecht. So bleiben bisherige TH2-zielgerichtete Therapien und T-Zell-immunsuppressive Therapie in der Klinik ohne durchschlagenden Erfolg (Anderson, 2008; Chanez et al., 2007). Anti-IL-4, -13 und -5- Therapien scheinen nur schwache Effekte zu haben. So konnte weder unter Anti-IL-5-Therapie noch unter kombinierter Anti-IL-4/IL-13-Therapie ein signifikanter Effekt auf die bronchiale Hyperreagibilität gezeigt werden (Leckie et al., 2000; Wenzel et al., 2007).

Die TH2-Antwort wird durch die Aktivität einer Reihe von Zytokinen, Zytokinrezeptoren und Transkriptionsfaktoren hoch- bzw. herunterreguliert, weshalb die Identifikation eines Korrelats auf genetischer Ebene komplex ist.

Zytokine sind sekretierte Proteine, die die Differenzierung, Aktivierung und Proliferation von Zellen steuern und eine zentrale Rolle bei der Organisation der allergischen Entzündung spielen. Die Steuerung der Immunantwort basiert wesentlich auf dem komplexen Wirken einer Vielzahl von Zytokinen, die jedoch oftmals zum Teil überlappende oder konzentrationsabhängige Effekte haben, syn- oder antagonistisch agieren können und daher ein ebenso herausforderndes wie vielversprechendes Zielobjekt möglicher neuer Therapieansätze darstellen.

Transkriptionsfaktoren bezeichnen Proteine, die die Transkription von Genen regulieren. So können sie im Zellkern an die DNA binden und den Promotor entsprechend aktivieren oder reprimieren, sodass die Initiation der Transkription und damit die Herstellung entsprechender mRNA, vereinfacht formuliert die Ablesung des entsprechenden Gens, beeinflusst wird.

Die Untersuchung ihrer Regulation kann somit neben der Analyse sekretierter Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen auf einer weiteren Ebene Aufschluss geben über die Modulation der Immunantwort in der jeweiligen Probandenkohorte.

1.3 Diagnostik und Therapie

Diagnostisch wird heutzutage die Sensibilisierung auf spezifische Allergene im Sinne einer Typ I-Allergie mithilfe allergologischer Diagnostik wie dem Skin-Prick-Test sowie der Bestimmung des spezifischen IgEs im Serum nachgewiesen. Wichtig ist hierbei stets die Berücksichtigung der anamnestischen Informationen; denn nur bei einer zur Anamnese passenden nachgewiesenen Sensibilisierung kann von einer Allergie gesprochen werden.

Beim Prick-Test werden die jeweiligen Allergene in Tropfenform auf die Haut aufgetragen und diese im Anschluss leicht mit einer Lanzette angestochen.

Die Bestimmung des Gesamt-IgEs im Blut kann einen generellen Hinweis auf das mögliche Vorliegen einer allergischen Erkrankung bzw. Disposition geben, bei erhöhten Werten ist jedoch stets spezifischere Diagnostik vonnöten. Ein Nachweis und eine Quantifizierung allergenspezifischer IgE-Antikörper erfolgt etwa im RAST oder ImmunoCAP, bei dem im Patientenblut vorhandenes spezifisches IgE an Testallergene bindet und durch enzymatische Markierung messbar gemacht wird. Dies erlaubt jedoch nur begrenzt eine Aussage über die Schwere der Symptome und korreliert oft nicht mit dem klinischen Bild.

Therapeutisch kann zwischen kausalen und symptomatischen Therapiemöglichkeiten unterschieden werden. Symptomatisch sind die Verwendung von Nasensprays, Antihistaminika sowie beim Asthma von kurz- und langwirksamen Bronchodilatoren sowie inhalativen und bei schwererem Verlauf auch oral eingenommenen Glucocorticoiden etabliert. Jedoch gibt es nach wie vor Patienten mit therapierefraktärem Asthma, die auch auf hochdosierte Glucocorticoide nicht ansprechen (Ito et al., 2006).

Neben der im Alltag nur bedingt durchführbaren Allergenkarenz ist die einzige bis dato in klinischer Routine angewendete kausale Therapie, um die überschießende Reaktion des Immunsystems langfristig zu verhindern, die spezifische Immuntherapie, in subcutaner (SCIT) bzw. sublingualer Verabreichung (SLIT). Hierbei werden sehr niedrige, langsam steigende Dosen des entsprechenden Allergens verabreicht, wodurch eine Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Allergen entwickelt werden soll (Pfaar et al., 2014). Die spezifische Immuntherapie greift an mehreren Stellen der bereits geschilderten pathophysiologischen Mechanismen der allergischen Reaktion ein.

Ein zentraler Wirkmechanismus der SCIT ist die Aktivierung allergenspezifischer T-regulatorischer Zellen (Treg, vgl. Abbildung 2). Die Tregs, aber auch aktivierte Antigen-präsentierende Zellen wie DC, setzen IL-10 und TGF β frei, die die Proliferation von T-Zellen hemmen können und lokal antiinflammatorisch wirken (C. A. Akdis & Blaser, 2000; Schmidt-Weber & Blaser, 2005; Till et al., 2004). Insbesondere IL-10 wirkt außerdem auf B-Zellen, indem die dortige IgE-Produktion gehemmt und die Produktion von IgG4-Antikörpern stimuliert wird. IgG wiederum hemmt die Bindung des IgE-Allergen-Komplexes an Dendritische Zellen und B-Lymphozyten. IL-10 wirkt daneben nicht nur herabregulierend auf Eosinophilenfunktion und -aktivität, sondern hemmt auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α) aus Mastzellen (Marshall et al., 1996). Darüber hinaus inhibieren die Treg-Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit Mastzellen deren Degranulation (Gri et al., 2008).

Daneben scheint sich durch die SCIT die bei Allergikern vorliegende Prädominanz der TH2-Antwort zu relativieren und das Zytokinprofil Richtung TH1 zu verschieben (Ebner et al., 1997; Till et al., 2004). So zeigten Wambre et al., dass allergenspezifische TH2-Zellen bei der Immuntherapie deutlich stärker reduziert werden als TH1-Zellen und es somit im Verlauf der Therapie zu einem relativen Anstieg der TH1-Zellen kommt (Wambre et al., 2012).

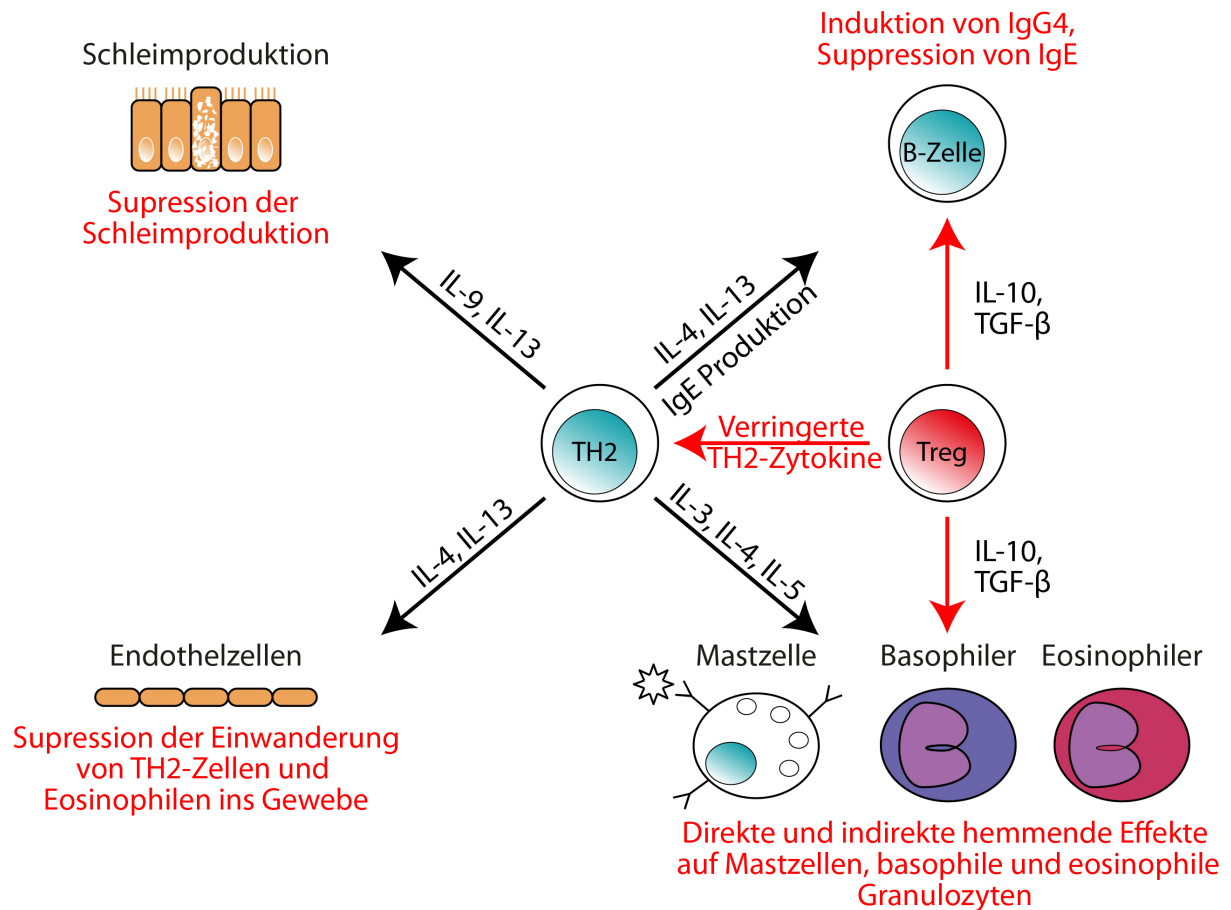


Abbildung 2: Wirkmechanismen der Treg-Zellen
modifiziert nach (M. Akdis & Akdis, 2007)

Die von Tregs freigesetzten Zytokine IL-10 und TGF- β hemmen die IgE-Produktion und hemmen die durch Mastzellen, Baso- und Eosinophile vermittelte allergische Entzündungsreaktion. Zudem kommt es zur Hemmung der TH2-vermittelten Effekte.

Die Effektivität der SCIT bezüglich Besserung der Symptome sowie Reduktion benötigter Medikamente ist in einer Vielzahl placebokontrollierter, doppelblinder Studien nachgewiesen worden (Calderon et al., 2007). Neben einer verbesserten Lebensqualität ist auch die Langzeitwirkung nach Therapieende erwiesen (Durham et al., 1999; Eng et al., 2006). Bei neben der allergischen Rhinitis gleichzeitig bestehendem allergischen Asthma reduziert die SCIT in der Regel auch die bronchialen Symptome (Bousquet et al., 1998). Darüber hinaus hat die spezifische Immuntherapie einen präventiven Effekt, beugt also der Entwicklung von weiteren Allergien und Asthma vor (Jacobsen et al., 2012). Jedoch wirkt die SCIT nicht bei jedem Patienten gleich gut.

Welche Veränderungen eine SCIT im Detail auf zellulärer und molekularer Ebene bewirkt, ist Gegenstand zahlreicher Studien und soll auch in dieser Arbeit untersucht werden.

1.4 Die Suche nach Biomarkern und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Unter Biomarkern versteht man charakteristische, objektiv messbare biologische Parameter, die, allgemein formuliert, auf einen normalen biologischen oder pathophysiologischen Prozess im Körper hinweisen können. Biomarker können verschiedene Funktionen innehaben: neben der Diagnosestellung etwa die Klassifikation von Subtypen und Einschätzungen zum Schweregrad und Krankheitsstadium. Sie können dem Verlaufs- und Therapiemonitoring dienen, darüber hinaus aber auch prognostische und prädiktive Aussagekraft innehaben. Zudem können sie Angriffspunkte für präventive Ansätze und für mögliche zielgerichtete, personalisierte Therapie mit Biologika darstellen, die zuvorderst vor allem bei schweren Ausprägungen der Erkrankung in Frage kommen.

Neben der klinischen Bedeutung ermöglichen Biomarker unter Umständen aber auch die Gewinnung wichtiger Erkenntnisse zu den zugrundeliegenden komplexen pathophysiologischen Mechanismen, etwa durch Auswertung der Effekte der „targeted therapy“.

Ein guter Biomarker sollte dabei ausreichende Sensitivität und Spezifität für die betreffende Erkrankung und therapeutische Intervention haben, und reproduzierbar, präzise, möglichst wenig invasiv und auf einfache Art und Weise bestimmt werden können.

Wie dringend derartig valide Biomarker nötig wären, ergibt sich aus der Tatsache, dass traditionelle Krankheitsmarker wie klinische Symptome und Lungenfunktions-Parameter der Komplexität der individuell vorliegenden Endotypen nicht gerecht werden und nur schlecht mit der Atemwegsentzündung korrelieren (Luskin, 2005).

Viele potenzielle Marker sind in der Literatur bereits untersucht worden.

Die Bestimmung des spezifischen IgE im Serum zum Nachweis einer Sensibilisierung im Rahmen der Diagnosestellung ist im klinischen Alltag, wie bereits beschrieben, längst Routine.

Auch zur Definition von verschiedenen Asthma-Endotypen gibt es schon seit geraumer Zeit einige Ansätze, neben der Einteilung in intrinsisches und IgE-vermitteltes, allergisches Asthma etwa die Einteilung in eosinophiles und neutrophiles Asthma. Die klare Zuordnung bestimmter Phäno- zu bestimmten Endotypen ist dabei allerdings nur teilweise möglich.

Einen im klinischen Alltag verwendeten Biomarker für das Wirksamkeits-Monitoring der spezifischen Immuntherapie gibt es derzeit nicht (Chaker et al., 2017). Als Marker mit hohem

Potential konnte etwa das allergenspezifische IgG4 als compliance-Marker und das sIgE/tIgE-Verhältnis (Verhältnis spezifischen IgEs zu Gesamt-IgE) sowie IgE-FAB (facilitated antigen binding) als Biomarker fürs klinische Outcome identifiziert werden (Shamji et al., 2017).

Auf der Suche nach neuen Biomarkern kommen mehrere Untersuchungsmaterialien in Frage, dann wiederum sind verschiedene Ebenen zu unterscheiden: neben der zellulären Ausprägung etwa die Betrachtung der freigesetzten Zytokine oder auf genetischer Ebene die Analyse der vorhandenen RNA.

Eine einfache Methode zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial ist die Abnahme von peripherem Blut. Hier berichten etwa Bartemes et. al. von vermehrt ILC2 (innate lymphoid cells 2) im Blut von Asthmatikern (Bartemes et al., 2014) und Vocca et al. weisen erhöhte IL-33-Spiegel im Blut von Asthmatikern und Probanden mit Allergischer Rhinitis nach (Vocca et al., 2015).

Neben der Betrachtung der systemischen Veränderungen bei Betroffenen (widergespiegelt durch potentielle Biomarker im Blut) kann das Augenmerk aber auch vermehrt auf die lokale Entzündungsreaktion, gleichsam den Ausgangspunkt des allergischen Geschehens, gerichtet werden. Material aus den unteren Atemwegen kann hier auf invasive Art und Weise mittels Bronchialbiopsie und bronchoalveolärer Lavage im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnen werden. Daneben gibt es die nicht-invasive Möglichkeit der Gewinnung von gelösten Komponenten in der Ausatemluft (exhaled breath condensate = EBC). Vorteilhaft ist hier die einfache und patientenfreundliche Anwendung, jedoch gibt es Verbesserungsbedarf hinsichtlich der Standardisierung und oftmals ist die Detektion von Biomarkern aus dem gewonnenen Material problematisch (Diamant et al., 2010).

Eine kaum invasive, jedoch valide und reproduzierbare Methode zur Materialgewinnung stellt die Induktion von bronchialem Sputum dar (Nicholas & Djukanovic, 2009; Spanevello et al., 1997). Als Sputum wird das Sekret der unteren Atemwege bezeichnet, das neben Wasser Proteine wie Mucine und Zytokine sowie zahlreiche Zellen des Immunsystems enthält, darunter neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, B- und T-Lymphozyten und Makrophagen (Normwerte zur Zelldifferenzierung im Sputum bei Erwachsenen (Veras et al., 2011; U. M. Zissler, 2012): Makrophagen: 57 - 80 %, Neutrophile Granulozyten: < 35 %, Eosinophile Granulozyten: < 2 %, Lymphozyten: < 3 %).

Durch Inhalation mit Kochsalzlösung kann nach einem standardisierten Protokoll Sputum in hoher Qualität gewonnen werden, welches nach entsprechender Aufreinigung für Zellzählung, durchflusszytometrische Analysen sowie Untersuchung des Transkriptomts mittels PCR sowie

Microarrays verwendet werden kann. Letzteres soll den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden.

Insbesondere die Zellzahlen von Eosinophilen und Neutrophilen aus induziertem Sputum können zur Charakterisierung von Endotypen dienen (eosinophiles vs. neutrophiles Asthma) (Baines et al., 2014; Fahy, 2009) und sind reproduzierbare und validierte Marker der Entzündung der unteren Atemwege (Spanevello et al., 1997). Die Eosinophilenzahl ist bei Asthmatikern erhöht und korreliert mit der FEV1-Reduktion (Baigelman et al., 1983) und mit der Schwere der Erkrankung (Jatakanon et al., 2000; Louis et al., 2000). Darüber hinaus hat sie eine prädiktive Aussagekraft bezüglich des klinischen Ansprechens auf Corticosteroide (Brightling et al., 2005). Sogar direkt therapeutisch relevante Perspektiven eröffnen sich durch die Eosinophilenzählung im Sputum: Green et al. zeigten in einer randomisiert-kontrollierten open-label-Studie, dass eine Normalisierung der Eosinophilenzahl im induzierten Sputum mit Reduktion von Asthma-Exazerbationen und Verbesserung der Lungenfunktionsparameter und Symptomscores einhergeht (Green et al., 2002).

Neben der Zellzählung sind im Sputum nach Zentrifugation aber auch im Überstand eine Vielzahl gelöster Entzündungsmarker wie Zytokine, Chemokine und Proteasen nachweisbar, so etwa das eosinophile kationische Protein (ECP), dessen Menge mit der Eosinophilenzahl korreliert (Efthimiadis et al., 1997) und nach antiinflammatorischer Therapie abnimmt (Bacci et al., 2002). Als mögliche Biomarker für das Remodeling des Atemwegsepithels konnten im Sputumüberstand bei Asthmatikern nach Allergenexposition erhöhte MMP-9-Level nachgewiesen werden (Cataldo et al., 2002).

Auch die Extraktion von mRNA aus Sputumzellen zur Evaluierung möglicher Biomarker ist in der Literatur bereits beschrieben. Die Transkriptomanalyse erfolgt hierbei mittels PCR (de Kluijver et al., 2002; Truyen et al., 2006) bzw. Microarray (Alexis et al., 2008; Baines et al., 2011). Eine genauere Beschreibung der hier bereits erzielten Ergebnisse folgt ausführlich im Kapitel „Diskussion“.

Viele Studien haben bereits Asthma-Phänotypen auf Basis klinischer oder demographischer Aspekte oder anhand der Sputum-Zellzahlen identifiziert, jedoch gibt es bislang nur wenige, die auf Ebene der Transkription Subtypen mit Bezug zum klinischen Erscheinungsbild klassifiziert haben (Baines et al., 2011).

Auch wenn, wie soeben beschrieben, eine Reihe potentieller Biomarker identifiziert werden konnte, ist für die Betroffenen der Nutzen begrenzt, da es in vielen Bereichen keine etablierten Biomarker gibt, die im klinischen Alltag angewendet werden.

Die vorliegende Arbeit soll auf dem Weg dorthin durch genaue Charakterisierung des Sputum-Transkriptoms der verschiedenen Subgruppen (Allergiker mit/ohne Asthma, mit/ohne SCIT, in/außerhalb der Pollensaison) ihren Beitrag zum weiteren pathophysiologischen Verständnis leisten und auf diese Weise dazu beitragen, dass in Zukunft die Therapie noch effektiver für jeden einzelnen gestaltet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

Geräte

Gerät/Produktname	Hersteller
Pari Boy SX	PARI
Handspirometer SpiroPro	Jaeger
Zentrifuge EBA20 (für ImmunoCAP-Vorbereitung)	Hettich
Zentrifuge ROTINA 380R (für PBMC)	Hettich
Zentrifuge 5430R (für nasale Sekrete)	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Megafuge 1.0R	Thermo Scientific
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer mit zugehöriger Software: ND1000, V. 3.8.1.	Thermo Fisher Scientific
Agilent BioAnalyzer 2100 mit zugehöriger Software: 2100 Expert	Agilent Technologies
Thermomixer 5437	Eppendorf
Thermocycler (Labcycler)	sensquest
Mikrozentrifuge MicroStar 17	VWR
ViiA 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Heidolph MR 3001 Magnetrührer SECTOR S 600 plate reader	Heidolph Meso Scale Discovery
Shandon Cytoclip (Zytospinhalter)	Thermo Fisher Scientific
Cytospin 4 (Zytospinzentrifuge)	Thermo Fisher Scientific
Zählkammer Neubauer Improved 0,0025 mm ³	Marienfeld GmbH

2.2 Probandenkollektiv

In die Studie wurden Personen mit allergischer Rhinitis auf Gräser- und/oder Birkenpollen mit und ohne Asthma sowie mit und ohne SCIT (= subkutane spezifische Immuntherapie = Hyposensibilisierung) eingeschlossen sowie gesunde Kontrollprobanden ohne Allergien, die nicht schwanger, akut erkältet oder kardiopulmonal instabil oder jünger als 18 Jahre alt waren. Es wurde stets darauf geachtet, dass bei den Probanden kein akuter Atemwegsinfekt und keine systemische Immunsuppression, etwa systemische Steroideinnahme, vorlag, um die späteren Analysen nicht zu verfälschen. Die Dauer der bereits erfolgten SCIT betrug nicht bei allen jeweiligen Probanden volle 3 Jahre, mindestens aber ein volles Jahr.

Wie in Abbildung 3 veranschaulicht, wurden in der Pollensaison (in der „in-season“- Visite) 40 Allergiker im Zeitraum von Mai bis Juli 2014 gesehen, davon 12 Asthmatiker mit SCIT, 9 Asthmatiker ohne SCIT, 10 Nicht-Asthmatiker mit SCIT und 9 Nicht-Asthmatiker ohne SCIT (vgl. Abbildung 3); des Weiteren 12 Kontrollprobanden, bei denen neben einer ausführlichen Anamnese ein Prick-Test sowie ein ImmunoCAP-Test auf Inhalationsallergene (sx1) sowie das Gesamt-IgE zur Objektivierung der Allergie-Freiheit durchgeführt wurden.

Außerhalb der Pollensaison (in der „out-of-season“-Visite) nahmen 38 der 40 Allergiker sowie 11 der 12 Kontrollprobanden wieder teil, zusätzlich wurden weitere 10 Kontrollprobanden untersucht. Der Zeitraum der Visiten erstreckte sich hier von November 2014 bis Anfang März 2015.

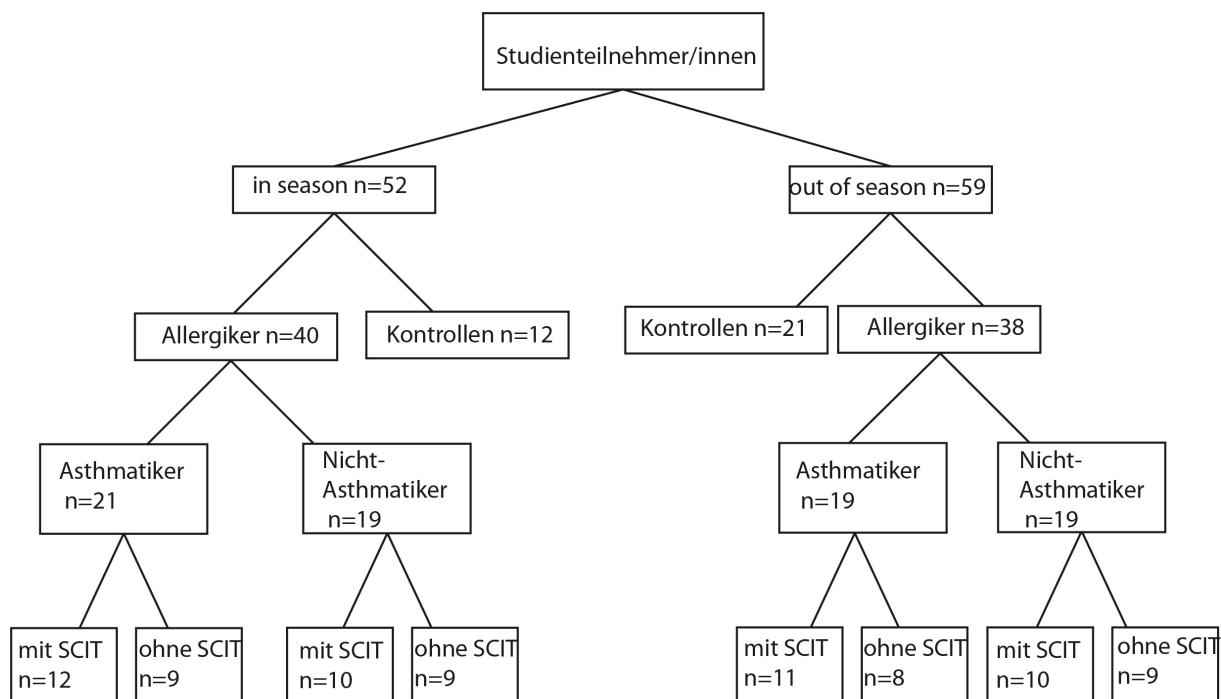


Abbildung 3: Übersicht über das Probandenkollektiv

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München hat der Durchführung der Studie zugestimmt. Die Teilnahme war für alle Probanden freiwillig und eine Einverständniserklärung wurde jeweils nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Unterrichtung über Ziel, Vorgehensweise, mögliche Risiken und Unannehmlichkeiten der Studienteilnahme unterschrieben. Datenschutzbelange waren zu jeder Zeit gewährleistet. Die Studie wurde entsprechend der Prinzipien für Good Clinical Practice und der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

2.3 Induktion von Sputum

2.3.1 Geräte und Materialien

Folgende Geräte und Materialien wurden zur Induktion von Sputum bei den Probanden verwendet:

- Salbutamol (Sultanol Dosier-Aerosol, 100 μg pro Sprühstoß)
- PariBoy (PARI TurboBOY SX)
- Spirometer SpiroPro+ (Jaeger)
- Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung) zur Inhalation in den Konzentrationen 3 %, 4 % und 5 %
- Nasenklemme
- Falcon (50 ml) zum Sammeln des Sputums
- Stoppuhr
- Trinkwasser, Papiertaschentücher, Plastikbecher
- Materialien zum Reinigen (SecuSept), Desinfektionslösung
- Notfallkoffer

2.3.2 Ablauf der Sputum-Induktion


Zunächst wurde bei jedem Probanden eine dreimalige Messung der Lungenfunktion mithilfe des Spirometers unter ausführlicher Anleitung sowie Erläuterung des durchzuführenden Atemmanövers vorgenommen. Bestimmt wurden dabei die Vitalkapazität (FVC), die Einsekundenkapazität (FEV1), der Tiffeneau-Index (FEV1/FVC) sowie die mittlere expiratorische Atemstromstärke bei noch 50 % bzw. 25 % der VC (MEF50 bzw. MEF25).

Der höchste FEV1-Wert aus diesen drei Versuchen diene als Baseline-FEV1-Wert vor der Bronchospasmyse, um den Lyse-Effekt zu dokumentieren. Nach Einnahme von 4 Hüben Salbutamol (entspricht 400 μg) und einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde erneut eine dreimalige Messung der Lungenfunktion durchgeführt.

Die Einnahme von Salbutamol diene dabei der Vermeidung einer Bronchoobstruktion durch die anschließende Inhalation hypertonen NaCl-Lösung und darüber hinaus zur Demonstration der Reversibilität einer evtl. vorhandenen Atemwegsobstruktion bei Patienten mit Asthma.

Nur bei einem Post-Lyse-FEV1-Wert von $> 70\%$ des Baseline-Wertes wurde mit der Induktion begonnen. Dazu wurde zunächst 7 Min. mit 3% NaCl-Inhalationslösung (10ml) inhaliert, wobei die Probanden die Nasenklemme verwendeten und auf eine tiefe Atmung sowie aufrechte Sitzhaltung achteten. Nach gründlicher Reinigung von Nase und Mund sowie mehrmaligem Gurgeln mit Wasser (mit dem Ziel einer Verringerung des Plattenepithelzellen-Anteils im Sputum) wurden die Probanden zur Beförderung des Sputums aus den unteren Atemwegen durch Husten aufgefordert und dieses im Falcon-Röhrchen gesammelt. Bei der nun folgenden Messung der Lungenfunktion wurde der Wert der FEV1 der Messung vor der ersten Inhalation gegenübergestellt (vgl. Abbildung 4). Wenn er bei über 90% des Vorwertes lag, wurde die Inhalation, diesmal mit 4% NaCl, für weitere 7 Min fortgeführt. Lag der Wert über 80% , aber unter 90% des Ausgangswertes, wurde noch zwei weitere Male gemessen und, falls der Wert unverändert im genannten Bereich lag, die Inhalation ohne Steigerung der Konzentration, d. h. weitere 7 Min. mit 3% NaCl durchgeführt. Lag der Wert unter 80% , wurde die Inhalation an dieser Stelle abgebrochen und notfallmäßig Salbutamol verabreicht.

Ansonsten erfolgte in analoger Weise nach der zweiten Inhalation die erneute Sputumproduktion mit vorhergehender gründlicher Reinigung von Mund und Nase und nachfolgender FEV1-Messung. Hierbei wurde verfahren wie oben bereits beschrieben. Nach der Inhalation mit 5% NaCl mit anschließender Sputumgewinnung und Spirometrie war die Induktion abgeschlossen. Das im Falcon gesammelte Sputum wurde stets zwischendrin auf Eis gelagert und umgehend der weiteren Aufbereitung zugeführt.

	Zentrum für Allergie und Umwelt Arbeitsanweisung Sputumgewinnung und Aufarbeitung	Dok.Nr. 001 Seite 5 von 19
		Version : 01 Stand: 01.05.2012

Sputumgewinnung und Aufarbeitung

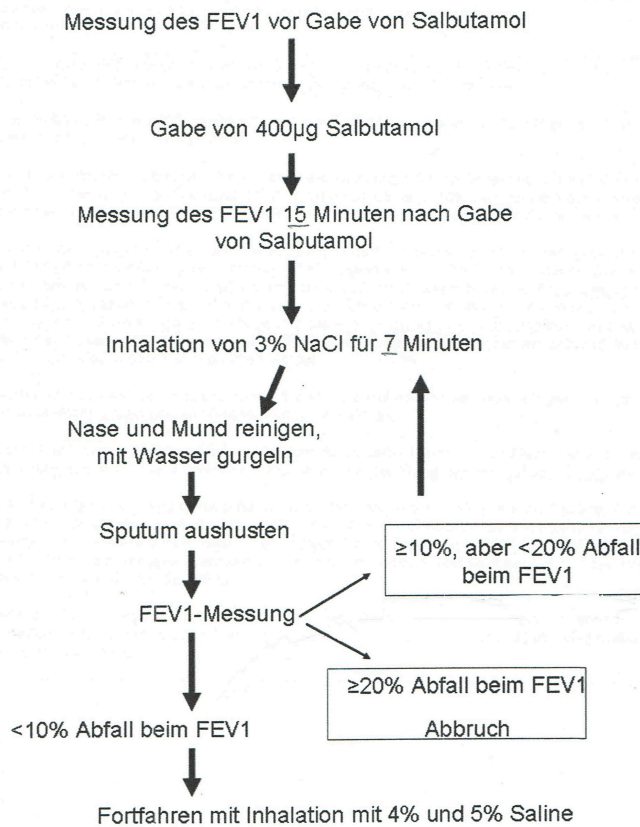


Abbildung 4: Workflow für Sputuminduktion

2.4 Weitere Untersuchungen

Neben der Sputuminduktion und der Lungenfunktionsmessung wurde mit den Probanden eine Anamnese, Blutentnahme, Allergietestung, sowie die Entnahme nasaler Sekrete durchgeführt.

2.4.1 Geräte und Materialien

- Materialien zur venösen Blutentnahme (Butterfly, BD Vacutainer Luer Adapter, BD Vacutainer Einmalhalter aus Kunststoff, Stauschlauch, Pflaster, Kompressen, Desinfektionsspray, BD Vacutainer Cell Preparation Tube Röhrchen)
- Einwegkürette zur Entnahme nasaler Scrapings (ASI Rhino-Pro® Nasal Mucosal Curette)
- Siebträgerkryoröhrchen (mit entnehmbarer Absorptivmembran im Siebträger)
- Nasenspekulum sowie kleine, gerade Halstead-Mosquito-Klemme zur Einlage sowie Entnahme der absorptiven Membran zur Akquise des nasalen Sekrets
- sterile PBS-Lösung

- steriles Methanol
- Mini-RQLQ (Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire)
- PSQ (Perceived Stress Questionnaire)
- Prick-Test (Allergopharma Testset-G zur Allergiediagnostik, Nr. 901 = NaCl, 902 = Histamin, 006 = Gräser, 108 = Birke, 708 = D. far., 725 = D. pter., 309 = Katze)

2.4.2 Ablauf der Untersuchungen

Nach der ausführlichen Aufklärung über Ablauf und Ziel der Untersuchung sowie mögliche Risiken und Nebenwirkungen wurden die Probanden zu Beginn jeder Visite bezüglich ihrer aktuellen Beschwerden allergischer Art befragt. Bei Asthmatikern wurde hier mithilfe des GINA-Scores eine Einschätzung über den Status der Kontrolle über die Erkrankung erhoben (The Global Initiative for Asthma, 2012).

Des Weiteren wurden die Probanden insbesondere über Rauchverhalten, Einnahme von Medikamenten sowie Vorhandensein anderer atopischer Erkrankungen wie Neurodermitis befragt. Zur Evaluation des persönlichen Belastungs- bzw. Stresslevels und der Einschränkung bzw. des subjektiven Leidensdrucks wurden die Probanden gebeten, den Mini-RQLQ sowie PSQ auszufüllen. Der Mini-RQLQ- Fragebogen (siehe Anhang 7.2) erfasst die Beeinträchtigung der Lebensqualität innerhalb der vorangegangenen Woche durch die Allergie (Einschränkung von Alltags- bzw. Freizeitaktivitäten und Schlaf sowie Schweregrad der Rhinoconjunctivitis- Symptome). Juniper et al. zeigten, dass der Mini-RQLQ ein valides Instrument zur Erfassung der Lebensqualität bei Patienten mit allergischer Rhinitis darstellt (Juniper et al., 2000).

Der PSQ-Fragebogen wiederum dient der Erfassung des subjektiv empfundenen Stresslevels innerhalb der letzten 4 Wochen (u. a. Gefühl der Überforderung, Erschöpfung, Anspannung; siehe Anhang 7.3).

Die Blutentnahme erfolgte mithilfe eines handelsüblichen Butterflys. Zur Vorbereitung für den anschließenden ImmunoCAP wurde das gewonnene Blut 6 Min. bei 4 °C bei 6000 rpm zentrifugiert.

Bei Patienten, bei denen noch keine entsprechenden Untersuchungsergebnisse vorlagen, wurde ein Haut-Prick-Test mit NaCl als Negativ- sowie Histamin als Positivkontrolle durchgeführt, dabei wurden Gräser, Birke, Dermatoides farinae sowie pteronyssimus und Katzenepithel untersucht. Nach 20 Minuten wurde die Größe der Quaddel mithilfe eines

Prick-Test-Lineals vermessen und das Ergebnis dokumentiert. Bei auffälligem Prick-Test wurden die entsprechenden Allergene im ImmunoCAP-Test untersucht (Phleum pratense = Wiesenlieschgras g6, Betula verrucosa = Birke Bet v1, ggf. auch Katzenschuppen e1, Milbenallergene). Bei unauffälligem Prick-Test *und* unauffälliger Anamnese wurde im ImmunoCAP-Test lediglich das Gesamt-IgE sowie sx1 (Screeningtest für Inhalationsallergene: Dermatophagoides pteronyssinus, Katzenschuppen, Hundeschuppen, Lieschgras, Roggen, Cladosporium herbarum, Birke, Beifuß) durchgeführt.

Da der Prick-Test spezifisch, aber nicht sehr sensitiv ist, während die Bestimmung des spezifischen IgEs eine gute Sensitivität bei mangelnder Spezifität aufweist, ist zur allergologischen Diagnostik bzw. der Detektion einer Sensibilisierung eine Kombination beider Verfahren sinnvoll.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Prick-Test, ImmunoCAP sowie Anamnese wurde für jeden Probanden ein individuelles Allergen- bzw. Sensibilisierungs-Profil erstellt.

Vor Beginn der Induktion wurde außerdem zur Überprüfung der kardiovaskulären Stabilität der Probanden eine Messung des Blutdrucks durchgeführt.

Nach der Sputuminduktion erfolgte die Einlage zweier absorptiver Membranstreifchen ans nasale Septum in Höhe der unteren Nasenmuschel beidseits mithilfe einer HNO-Klemme und -Spekulums. Diese wurden nach ca. 1-2 Minuten wieder entfernt, in die Siebträgerkryoröhrchen überführt und anschließend für 60 Min. bei 4 °C in 300 µl Methanol bzw. sterilem PBS inkubiert. Es folgte zur Eluierung des an die Trägermembran gebundenen Nasensekrets eine Zentrifugation für 5 Min. bei 4 °C und 6000 rpm in der Eppendorfszentrifuge. Die Proben wurden im Anschluss bei -20 °C eingefroren.

Des Weiteren wurde mit einer Einwegkürette ein Abstrich der unteren Nasenmuschel durchgeführt, das gewonnene Zellmaterial anschließend in 200 µl RNAprotect Cell Reagent gelöst und ebenfalls bei -20 °C für weitere Analysen asserviert.

2.5 Aufbereitung des Sputums

Geräte und Materialien

- Vortex- Genie 2 (Scientific Industries)
- Megafuge 1.0R (Thermo Scientific)
- DPBS (gibco by life technologies)
- RNAprotect Cell Reagent (Quiagen)

- Sputolysin/May-Grünwald/Xylol/Giemsa (Merck)
- Methanol (Fluka)
- Eukitt (Fluka)
- RNeasy MiniKit (Quiagen)
- QuantiTect Primer Assays (Quiagen)
- one-colour Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)
- Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies)
- Genespring Software GX 12.5 (Agilent Technologies)

Durchführung

Nach Gewinnung des Sputums wurde möglichst rasch (innerhalb von max. 2h) mit der Aufbereitung begonnen, da Verzögerungen mit zunehmender Anzahl abgestorbener Zellen bzw. degenerierter RNA/Proteinen einhergehen können. Zudem wurde das Material stets auf Eis gelagert. Nach Gewichtsbestimmung der Sputumplaques nach Trennung von Saliva erfolgte die Zugabe der vierfachen Menge einer 1:10 verdünnten Sputolysinlösung mit anschließender 10-minütiger Inkubation bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Zugabe der zweifachen Menge an DPBS mit 15 Sek. Vortexen sowie Filtrierung durch ein 70 μm Zellsieb. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min. bei 4 °C mit ausgeschalteter Bremse wurden pro Proband 4 Aliquots mit mindestens 200 μl Überstand bei -80 °C eingefroren, zudem ein Aliquot mit 100 μl Überstand und 100 μl Methanol. Das übrige Zellpellet wurde zur Stabilisierung der RNA mit 1 ml RNAProtect Cell Reagent versetzt und bis zur späteren Verwendung zur RNA-Extraktion bei -80 °C eingefroren, zumal RNAsen bis -60 °C aktiv sein können.

Daneben erfolgte ausgehend von der oben genannten Zellsuspension die Herstellung von Zytospins und Durchführung einer Durchflusszytometrieanalyse; analog wurde mit den aus der Blutabnahme gewonnenen PBMCs verfahren. Hierzu soll an dieser Stelle auf die Arbeit von S. Rothkirch, „Durchflusszytometrische Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im Sputum und peripheren Blut“ verwiesen sein (Rothkirch, 2017).

Anfertigung von Zytospins und Zelldifferenzierung

Für jeden Probanden wurden aus der Sputumzellsuspension Zytospins angefertigt, die bei 450 rpm über 6 Min. zentrifugiert und anschließend 30 Min. lichtgeschützt getrocknet und 5 Min. im Methanolbad fixiert wurden. Nach Färbung mit May-Grünwald-Lösung (8 Min.) und mit Giemsa-Lösung (35 Min.) wurden die Slides lichtgeschützt zum Trocknen aufbewahrt, für jeweils 10 Sekunden in Xylol getaucht und wiederum getrocknet. Zur Fixierung wurden

jeweils 3 Tropfen Eukitt appliziert und daraufhin luftblasenfrei mit dem Deckgläschen verschlossen. Zur Zelldifferenzierung mit einer Gesamtzahl von 400 Zellen wurden pro Kreuzfeld 100 Zellen mäanderförmig in 100facher Vergrößerung von zwei Personen unabhängig ausgezählt und der Durchschnittswert gebildet.

RNA-Processing/Transkriptomanalyse

Unter dem Transkriptom versteht man die Gesamtheit der Gene, die sich im Prozess der Umschreibung von DNA in RNA befinden (= transkribiert werden). Da dieser Schritt Voraussetzung ist für die folgende Translation, also Umschreibung der RNA in eine Aminosäuren-Sequenz, die schlussendlich das entsprechende Protein ergeben, erhält man so Aufschluss über die aktuell abgelesenen Gene.

2.5.1 RNA-Isolation

Aus dem in RNAProtect Cell Reagent bei -80 °C eingefrorenen aufgereinigten Sputum wurde mithilfe des Quiagen MiniKits nach Anleitung des Herstellers RNA extrahiert. Dazu wurde zunächst nach Zentrifugation der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in 350 μ l RLTPuffer resuspendiert, anschließend auf den QIAshredder gegeben und mittels Zentrifugation homogenisiert. Zur Isolierung der RNA erfolgte die Mischung mit 70%igem Ethanol desselben Volumens und Übertragung auf die RNeasy Spin Column sowie Zentrifugation für 15 Sek. bei > 10.000 rpm. Nach einem Waschschriff mit RW1-Puffer erfolgte das Auftragen von jeweils 80 μ l DNase-Lösung (und anschließender 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur) zum Verdau der eventuell enthaltenen DNA (DNase-Lösung aus 10 μ l DNaseI Stock Solution und 70 μ l RDD Puffer). Nach mehreren Waschschriffen (gemäß Anleitung des Herstellers zunächst mit RW1 Puffer, dann mit RPE Puffer) wurde die RNA in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert.

Die eluierte RNA wurde direkt im Anschluss mittels eines NanoDrop Spektrophotometers auf Konzentration und Reinheit untersucht und umgehend bei -80 °C eingefroren.

Die gemessenen Werte zur Reinheit waren maßgeblich für die Auswahl der weiter verwendeten Proben, da die Qualität der RNA entscheidend für eine spätere Analyse der Genexpression ist. Zum Ausschluss einer Protein-Kontamination wurde die A260/280-ratio mit einem Zielwert von 2 herangezogen, analog die A260/230-ratio > 2 zum Ausschluss einer Kontamination mit organischen Verbindungen. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen

Absorptionsspektren zunutze: so absorbieren Nukleinsäuren typischerweise bei 260 nm, Proteine bei 280 nm und organische Verbindungen bei 230 nm.

Es folgte eine Qualitätsanalyse mithilfe des Bio-Analyzers, der nach dem Messprinzip der Mikrokapillargelelektrophorese den Grad der Degradation der RNA auf einer Skala von 1-10 angibt (niedriger Wert entspricht hoher Degradation und umgekehrt). Hier wurde für den RIN-Wert (RNA Integrity Number) ein Zielwert von > 5 angestrebt.

2.5.2 Microarrays

Mithilfe von Microarrays kann die mRNA-Menge einer Vielzahl von Genen zugleich bestimmt werden. Nach Umschreibung der mRNA in cRNA erfolgt die Detektion hierbei über komplementäre Hybridisierung der markierten cRNA mit den Sonden des RNA-Arrays.

Aus den vorhandenen RNA-Proben wurden in einer Zusammenschau aus klinischer Brisanz, Konzentration und Qualität der RNA (Ergebnisse aus nanodrop und Bio-Analyser-Messung) eine Auswahl von 40 Proben getroffen, jeweils eine in-season- und eine out-of-season-Probe desselben Probanden. Es wurden hierbei 10 Kontrollproben, 8 Proben von Asthmatikern mit SCIT, 6 Proben von Asthmatikern ohne SCIT, 8 Proben von Nicht-Asthmatikern mit SCIT und 8 Proben von Nicht-Asthmatikern ohne SCIT untersucht (vgl. Abbildung 5).

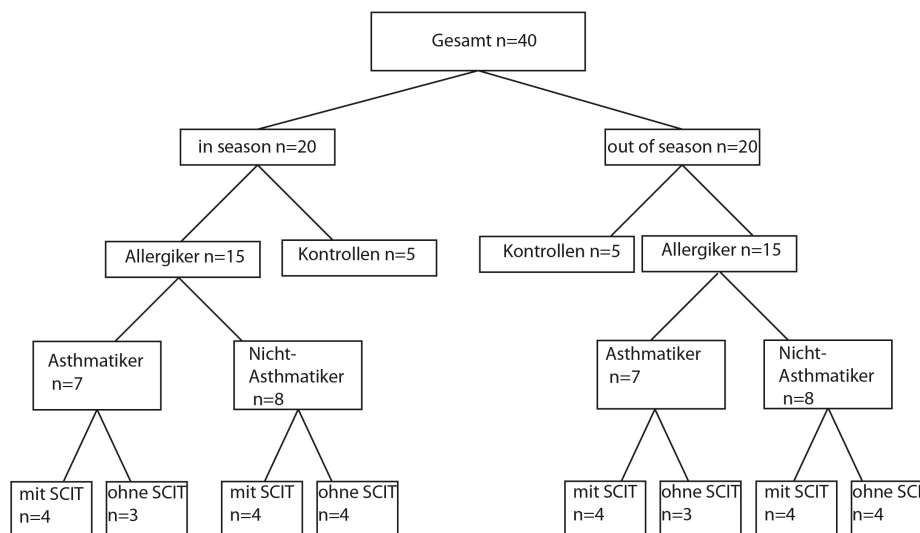


Abbildung 5: Übersicht Probandenkollektiv – Auswahl für Transkriptomanalyse

Die RNA wurde mithilfe des one-colour Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben amplifiziert und Cy3-gelabelt. Die Hybridisierung zu SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60 Microarrays (Agilent Technologies) erfolgte mit dem Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies).

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Genespring Software GX 12.5 (Agilent Technologies). Dabei wurde $p < 0,05$ und ein fold change $FC > 1,5$ verwendet. Beim Import der Daten wurde eine standard baseline Transformation zum Median aller Werte durchgeführt, inklusive log-Transformation und Berechnung der Fold Changes ($\log_2(A/B) = \log_2(A) - \log_2(B)$). Gene, die mehr als 1,5-fach reguliert waren, wurden weiter mithilfe des t-test analysiert. Die signifikant regulierten Gene wurden in entity lists zusammengefasst, die teilweise mithilfe von Venn-Diagrammen hinsichtlich Überschneidungen untersucht wurden. Um Veränderungen der Genexpression zu clustern, wurde Manhattan Cityblock (Ward's linkage) verwendet. Die Identifikation von sekretierten Mediatoren erfolgte entsprechend aktueller Literatur durch Verwendung der Genomatix software (München, Deutschland) durch Anwendung der GO-terms 0007267, 0008009, 0005125 und 0005615 für die sekretierten Mediatoren, beziehungsweise 00044212 und 0003676 für die Transkriptionsfaktoren.

2.5.3 Real-time qPCR

Die RNA von allen Probanden, bei denen die Konzentration ausreichte, um 100 ng RNA umzuschreiben, wurde mittels Reverser Transkription mit einem Mastermix (aus je 2 μl RTPuffer, 0,8 μl dNTPs, 2 μl Random Primer und 1 μl MultiScribe Reverser Transkriptase pro Ansatz) in cDNA umgeschrieben und bis zur Durchführung der PCR bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die RNA (Menge je 100 ng, jeweils unterschiedliches Volumen, da unterschiedliche Konzentration) wurde dabei mit RNasefreiem Wasser auf 14,2 μl aufgefüllt und im Anschluss jeweils 5,8 μl Mastermix dazugegeben. Es folgte die Reverse Transkription im Thermocycler. Im Anschluss erfolgte die Durchführung der PCR mittels Quiagen Primer-Assays für SCGB1A1 (Cat. No. QT00091091), IL-24 (Cat. No. QT00059059) und CCL20 (Cat. No. QT00012971). Die Annealing Temperatur betrug $55\text{ }^\circ\text{C}$, es erfolgten jeweils 40 Zyklen.

Mithilfe der PCR (= Polymerase Chain Reaction) ist es möglich, kleinste DNA-Mengen schnell in vitro zu vervielfältigen, was in einer vielfach wiederholten Abfolge von Zyklen aus Denaturierung, Annealing der Primer sowie Elongation mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen erfolgt.

Soll auf die ursprünglich vorhandene Menge an cDNA-Molekülen rückgeschlossen werden, stellt sich das Problem, dass die Vervielfältigungsfaktoren nicht konstant sind: zu Beginn ist die DNA-Menge sehr gering, gegen Ende der Reaktion nimmt u. a. die Aktivität der

Polymerase und die Menge der noch vorhandenen Nukleotide ab. Aus diesen Gründen lässt sich hier nur schwer eine genaue quantitative Aussage bezüglich der DNA-Menge treffen.

Besser geeignet ist hier die real-time PCR, die es ermöglicht, die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle bereits im Laufe der Reaktion in Echtzeit zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurde SYBRGreen verwendet, welches auf einem Fluoreszenzsignal zur Detektion der PCR-Produkte beruht: Nach Bindung an doppelsträngige DNA emittiert SYBRGreen ein starkes Signal, während es in Lösung kaum Fluoreszenz vorweist. Die Stärke der Fluoreszenz korreliert somit mit der Menge der entstandenen PCR-Produkte. Die relative Quantifizierung spezifischer mRNA mittels real-time RT-PCR stellt eine präzise Methode dar (Pfaffl, 2004).

Hierbei wird die Expression des Zielgens in Bezug zu der eines oder mehrerer Housekeeping-Gene gesetzt, bei welchen eine konstante und ubiquitäre Expression zu erwarten ist.

Vorteil gegenüber der absoluten Quantifizierung ist, dass z. B. Fehler bei der RT oder unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowohl das untersuchte als auch das Referenzgen betreffen und somit die Varianz weniger stark zum Tragen kommt (Pfaffl, 2004).

Der sogenannte Ct-Wert (cycle of treshold) steht für die Anzahl an Zyklen, nach denen ein definiertes Fluoreszenzniveau (und dementsprechend eine bestimmte Menge cDNA) erreicht wird, welches die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Ist der Ct-Wert bei einem Gen gering, korreliert dies mit einer stärkeren Expression (da bereits zu Beginn mehr Kopien des Gens in der Probe enthalten waren, sind weniger Verdopplungen nötig, um die Schwelle zu überschreiten).

Die sogenannte delta-delta-CT-Methode (Livak & Schmittgen, 2001) beschreibt dabei das Vorgehen, die Expression des Zielgens auf die des Referenzgens (= housekeeper gene = HKG) zu normalisieren ($\text{deltaCT} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$) sowie auf die Expression bei gesunden Kontrollen zu beziehen ($\text{deltadeltaCt} = \text{deltaCt Allergiker} - \text{deltaCt Kontrollen}$), wobei auch der Ct-Wert der Kontrollen auf den des Referenzgens normalisiert wird, also $\text{deltaCt Kontrollen} = \text{CtKontroll-Zielgen} - \text{CtReferenzgen}$, analog oben). In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Mittelwert von drei Referenzgenen (*GAPDH*, *Beta-Actin*, *TFRC*) normalisiert und aus diesen ein Mittelwert berechnet (Housekeeper-Index).

2.5.4 Expression auf Proteinebene

Um die Relevanz der beobachteten Unterschiede in der Genexpression auf Proteinebene zu untersuchen, wurden zudem für einige ausgewählte sekretierte Faktoren (CCL26, IL-5, IL-8) exemplarisch Messungen mit der MesoScale Discovery Plattform durchgeführt. Mittels Elektrochemilumineszenz ermöglicht diese die simultane Messung von mehreren Biomarkern im Multi-Array-Verfahren. Zugrunde liegt das Prinzip des Sandwich-ELISA.

Dazu werden die Proben in Wells gegeben, die mit eingebauten Elektroden und darauf gebundenen, für das jeweilige Zyto-oder Chemokin spezifischen Antikörpern versehen sind. Die Bindung zwischen dem jeweiligen Marker und für ihn spezifischen Antikörper wird wiederum durch einen zweiten, ebenfalls spezifischen Antikörper detektiert, welcher Ruthenium-konjugiert ist. Der Rutheniumkomplex emittiert bei elektrochemischer Stimulation Licht, sodass je nach Lichtemission Rückschlüsse auf die jeweilige Proteinkonzentration gezogen werden können.

Nach vorschriftsmäßiger Vorverdünnung der jeweiligen Standards wurden hierbei jeweils 50 μl pro Well im Verhältnis 1:1 mit Diluent 2 verdünnte Standards revers aufpipettiert und die Platte versiegelt für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontal-Vertikal-Schüttler bei 300 rpm durchmischt. Im Anschluss wurden nach dreimaligen Waschschritten mit je 150 μl Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween) je 25 μl der jeweiligen Antikörperlösung in jedes Well gegeben. Nach erneuter zweistündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf einem Horizontal-Vertikal-Schüttler, Zugabe der Streptavidin-Antikörperlösung (25 μl pro Well in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), erneuter Inkubation für 30 Min. und erneutem dreimaligem Waschen mit o.g. Waschpuffer wurde je Well 150 μl verdünnter Detektionspuffer (Read Buffer + H₂O bidest.) zugegeben und die Platte direkt im Anschluss eingelesen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der MSD Discovery Workbench® Analysis Software.

2.6 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die primäre Rohdatenerfassung erfolgte durch Übertragung der erfassten demographischen sowie klinischen Daten und Messergebnisse in eine Microsoft® Excel-Tabelle.

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPadPrism, Version 6.0.

Nach jeweiliger Überprüfung der Normalverteilung mit dem D'Agostino-Pearson-Test wurde für den Vergleich zweier unverbundener Gruppen bei Normalverteilung der t-Test für

unverbundene Stichproben (unpaired t-test), ansonsten der rangbasierte Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den Vergleich verbundener Gruppen (etwa Allergiker in vs. out-of-season) wurde entsprechend bei Normalverteilung der t-Test für verbundene Stichproben (paired t-test), ansonsten der Wilcoxon-Rang-Vorzeichentest verwendet. Für die Überprüfung von Korrelationen (z. B. Eosinophilenzahl und GINA-Score) wurde der Spearman-Test (two-tailed) verwendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt ($p < 0.05$). In der graphischen Darstellung (vgl. Abschnitt 3.2) ist die Signifikanz zudem durch Verwendung des Symbols „*“ veranschaulicht, dabei bedeutet „*“ = $p < 0,05$, „**“ = $p < 0,01$ und „***“ = $p < 0,001$, „****“ = $p < 0,0001$.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Von den ursprünglich in-season eingeladenen 53 Probanden konnten 52 verwertbares Sputum produzieren. Die Geschlechterverteilung war sowohl bei den Allergikern als auch bei den Kontrollprobanden nahezu gleichmäßig (siehe Tabelle 2 und Abbildung 6).

Tabelle 2:
Geschlechterverteilung

	Männer (%)	Frauen (%)
Gesamt	52,4 %	47,6 %
Allergiker	56,1 %	43,9 %
Kontrollen	45,5 %	54,5 %

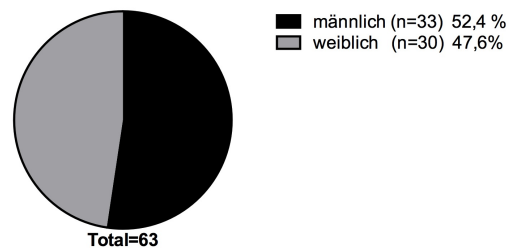


Abbildung 6: Geschlechterverteilung im Gesamtkollektiv

Es nahmen Probanden im Alter von 22 bis 63 Jahren teil, wobei der Großteil der Probanden (sowohl Kontrollprobanden als auch Allergiker) der Altersklasse 20-30 Jahre zuzuordnen war (siehe Tabelle 3 und Abbildung 7).

Tabelle 3:
Altersverteilung

	Alter in Jahren: Mittelwert (Min., Max.)
Gesamt	29 (Min. 22, Max. 63)
Allergiker	30 (Min. 22, Max. 63)
Kontrollen	26 (Min. 23, Max. 34)

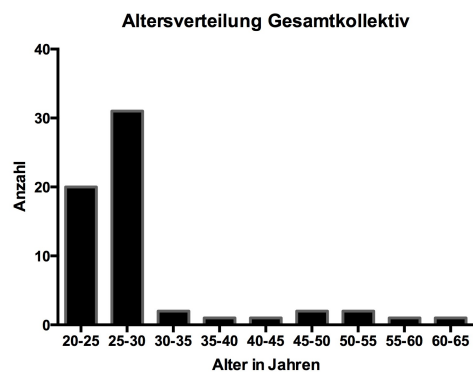


Abbildung 7: Altersverteilung im Gesamtkollektiv

In Bezug auf Alter ($p = 0,468$) und Geschlecht ($p = 0,420$) zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen der Gruppe der Allergiker und der Gruppe der Kontrollen. Lediglich hinsichtlich des BMI zeigte sich ein Unterschied ($p = 0,043$). So lag der Mittelwert des BMI bei den Allergikern mit $24,3 \text{ kg/m}^2$ ($SD 3,6$) etwas höher als bei den Kontrollen mit $22,7 \text{ kg/m}^2$ ($SD 3,5$); in beiden Fällen liegt der Wert im Normbereich.

Zusammengefasst ist eine weitgehende Homogenität bzw. Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen gewährleistet.

3.2 Klinische Daten

Es ließ sich bei den Allergikern ein signifikant erhöhtes Gesamt- IgE gegenüber den gesunden Kontrollprobanden nachweisen (vgl. Abbildung 8).

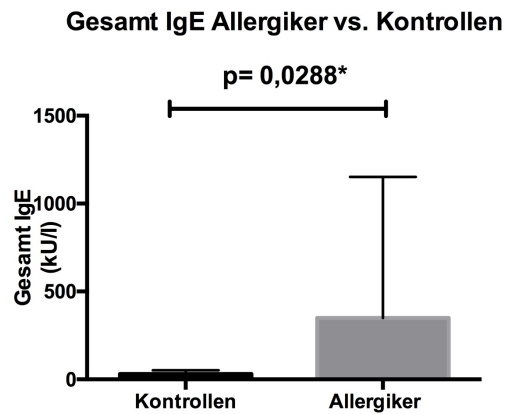


Abbildung 8: Gesamt-IgE Allergiker vs. Kontrollen

Die Verteilung der Allergensensibilisierung in unserem Probandenkollektiv gestaltete sich wie folgt:

Tabelle 4:
Sensibilisierungen im Probandenkollektiv

	Lieschgras (g6)	Birke (betv1)	beides (g6 + betv1)
n	9 (22,5 %)	2 (5 %)	29 (72,5 %)

Die Auswertung des GINA-Scores bei Asthmatikern zeigte höhere Scores in („Sommer“) gegenüber außerhalb der Pollensaison („Winter“), der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Abbildung 9).

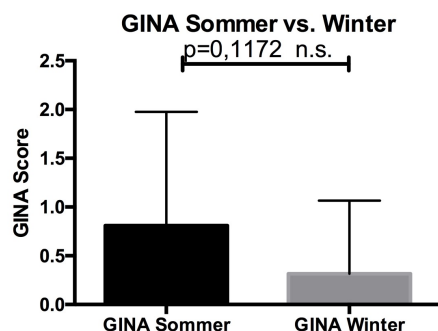


Abbildung 9: GINA-Score in vs. außerhalb der Pollensaison bei Asthmatikern

3.2.1 Lungenfunktion

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung bei den Probanden der jeweiligen Subgruppen.

Tabelle 5:

Charakterisierung des Probandenkollektivs in („in season“) bzw. außerhalb der Pollensaison („out of season“)

In season				
Subgruppe	Kontrollen	Allergiker gesamt	davon Asthmatiker	davon Nicht-Asthmatiker
Anzahl [n]	12	41	21	20
Alter [J]	26,6 (3,2)	30,0 (10,5)	33,8 (12,3)	26,1 (6,6)
Geschlecht [m/w]	7/5	23/18	15/6	8/12
FEV1 [%]	99,3 (13,3)	99,0 (13,4)	97,2 (11,9)	100,9 (15,0)
Tiffeneau [FEV1/VC]	93,9 (6,2)	89,5 (9,2)	85,4 (8,8)	93,6 (7,7)
MEF50 [%]	112,4 (30,4)	90,1 (23,4)	83,3 (18,3)	96,9 (26,4)
Out of season				
Subgruppe	Kontrollen	Allergiker gesamt	davon Asthmatiker	davon Nicht-Asthmatiker
Anzahl [n]	21	38	19	19
Alter [J]	26,0 (2,8)	30,3 (10,8)	34,6 (12,6)	26,1 (6,6)
Geschlecht [m/w]	10/11	22/17	14/5	8/12
FEV1 [%]	103,2 (12,8)	101,7 (15,6)	97,5 (14,6)	105,7 (15,8)
Tiffeneau [FEV1/VC]	89,9 (7,9)	88,5 (8,1)	84,6 (7,3)	92,2 (7,1)
MEF50 [%]	98,9 (19,1)	97,1 (29,3)	83,7 (29,4)	109,8(23,5)

Anmerkung: Angabe als Mittelwert (SD)

Da die Lungenvolumina bzw. Normwerte der Spirometrie abhängig von Geschlecht, Alter und Gewicht sind, ist zu Vergleichszwecken einerseits ein in Bezug auf diese Faktoren möglichst homogenes Probandenkollektiv sinnvoll, zum anderen sollten bei Vergleichen ebendiese Abhängigkeiten stets berücksichtigt werden.

Bei den Allergikern mit Asthma zeigte sich gegenüber den übrigen Probanden sowohl in- als auch out-of-season ein statistisch signifikant niedrigerer Tiffeneau-Index ($p = 0,002$, siehe Abbildung 10) sowie erniedrigte Werte für MEF25% ($p = 0,0248$, siehe Abbildung 11) und MEF50% ($p = 0,0038$, siehe Abbildung 12). In der Winter-Visite war außerdem der FEV1% bei den Probanden mit Asthma signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 13).

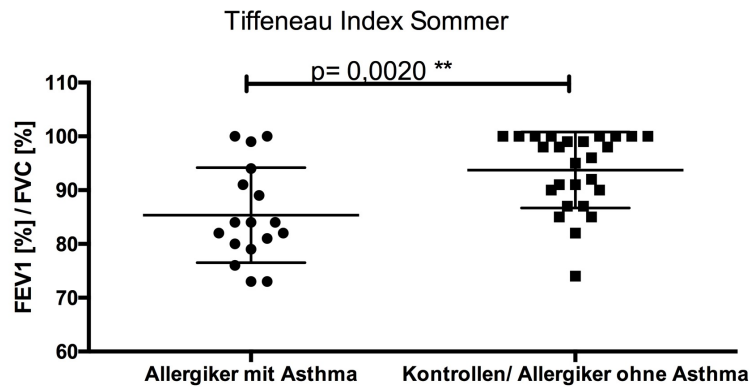


Abbildung 10: Tiffeneau-Index Asthmatiker vs. Nicht-Asthmatiker in der Pollensaison
Bei den Probanden mit Asthma zeigt sich in-season ein signifikant niedrigerer Tiffeneau-Index als bei den Probanden ohne Asthma.

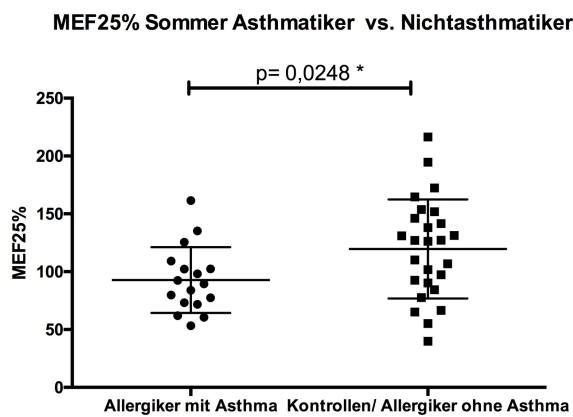


Abbildung 11: MEF25% Asthmatiker vs. Nicht-Asthmatiker in der Pollensaison
Bei den Asthmatikern zeigt sich ein signifikant niedrigerer Wert als bei den Nicht-Asthmatikern.

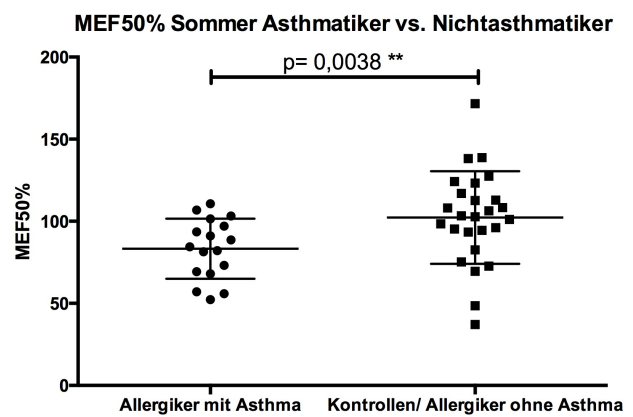


Abbildung 12: MEF50% Asthmatiker vs. Nicht-Asthmatiker in der Pollensaison
Bei den Asthmatikern zeigt sich ein signifikant niedrigerer Wert als bei den Nicht-Asthmatikern.

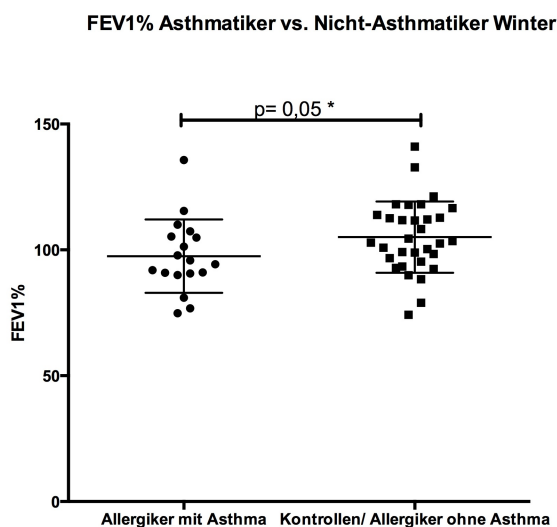


Abbildung 13: FEV1% Asthmatiker vs. Nicht-Asthmatiker außerhalb der Pollensaison
Hier zeigt sich eine signifikante Erniedrigung des FEV1% bei Probanden mit Asthma gegenüber gesunden Kontrollprobanden und Allergikern ohne Asthma.

3.2.2 Zelldifferenzierung und Korrelation zu klinischen Daten

Die nach oben genanntem Ablauf erfolgte Zellzählung erbrachte die in der folgenden Tabelle dargestellten Ergebnisse:

Tabelle 6:
Zelldifferenzierung im Sputum

in-season		
Subgruppe	Kontrollen	Allergiker
Leukozytenzahl x10 ⁴ /ml	22,46 (4,5-42,5)	35,16 (6,0-93,5)
Makrophagen [%]	83,30 (67,88-97,13)	73,35 (10,63-98,13)
Neutrophile [%]	15,06 (2,38-26,88)	23,48 (1,50-84,13)
Lymphozyten [%]	1,17 (0,0-4,75)	1,74 (0,0-6,38)
Eosinophile [%]	0,36 (0,0-1,00)	1,15 (0,0-3,50)
Basophile [%]	0,11 (0,0-0,25)	0,29 (0,0-2,25)
out-of-season		
Subgruppe	Kontrollen	Allergiker
Leukozytenzahl x10 ⁴ /ml	18,25 (5,0-45,0)	32,81 (7-149)
Makrophagen [%]	76,13 (37,13-96,00)	70,18 (14,75-96,13)
Neutrophile [%]	21,93 (1,50-62,30)	28,25 (2,88-84,13)
Lymphozyten [%]	0,71 (0,0-2,50)	0,89 (0,13-2,63)
Eosinophile [%]	0,20 (0,0-0,50)	0,44 (0,0-1,50)
Basophile [%]	0,05 (0,0-0,25)	0,07 (0,0-0,25)

Anmerkung: Angabe als Mittelwert (Min., Max.). Dabei gilt $p < 0,05$ bei Eosinophilen, ansonsten n.s.

Die Eosinophilenzahl korrelierte dabei bei Probanden mit allergischem Asthma bronchiale in der Pollensaison mit dem GINA-Score (Spearman-Korrelationskoeffizient $r = -0,388$, $p = 0,038$, $n = 17$).

3.2.3 RQLQ und PSQ

Während sich im PSQ keine signifikanten Unterschiede bei den jeweiligen Subgruppen identifizieren ließen, war im RQLQ-Score in-season ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) im Sinne von höheren Scores der Allergiker gegenüber den Kontrollprobanden festzustellen (siehe Abbildung 14). Darüber hinaus war auch der Vergleich der Scores der Allergiker in- vs. out-of-season im RQLQ hoch signifikant ($p < 0,0001$) mit höheren Werten im Sommer (siehe Abbildung 15), bei den Kontrollen hingegen, wie zu erwarten, nicht.

Dies illustriert den subjektiven Leidensdruck bzw. die Beeinträchtigung der Allergiker und unterstreicht die vorgenommene Klassifizierung anhand Anamnese und Allergietests.

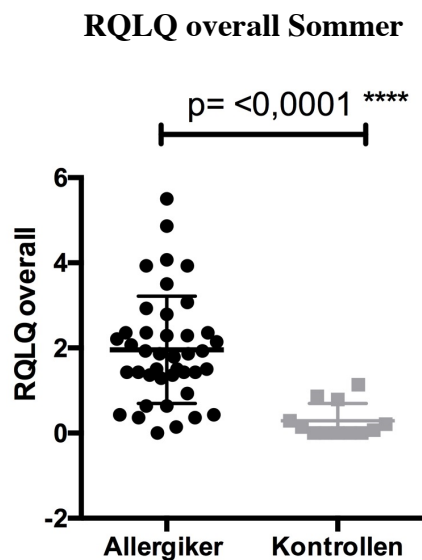


Abbildung 14: RQLQ-Gesamtscore Allergiker vs. Kontrollen
Ein hoher Score steht für eine stärkere Beeinträchtigung der Lebensqualität.

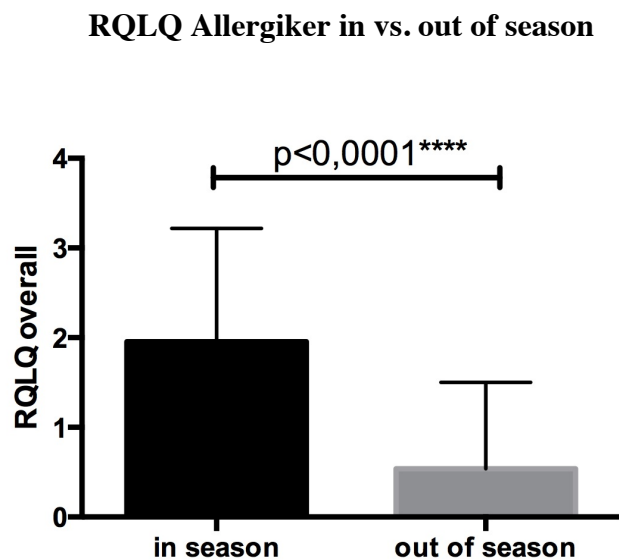


Abbildung 15: RQLQ-Gesamtscore in vs. außerhalb der Pollensaison bei Allergikern

In der Gegenüberstellung des RQLQ-Gesamtscores bei Allergikern mit vs. ohne SCIT zeigt sich in der Pollensaison ein statistisch signifikanter Unterschied (höhere Scores, also stärkere Belastung bei Allergikern ohne SCIT, vgl. Abbildung 16). Außerhalb der Pollensaison ist der Unterschied nicht signifikant.

RQLQ Gesamtscore Allergiker mit vs. ohne SCIT (Sommer)

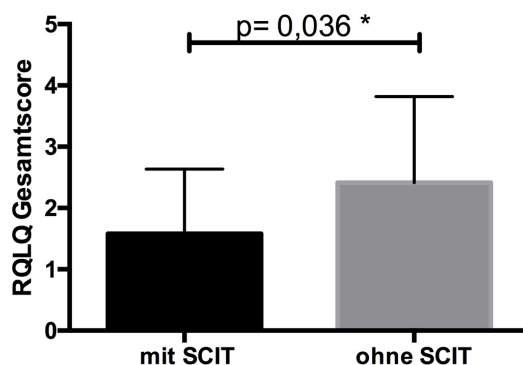


Abbildung 16: RQLQ-Gesamtscore in der Pollensaison bei Allergikern mit vs. ohne SCIT

3.3 Transkriptomanalyse (Microarray)

Die Schwerpunkte der Transkriptomanalyse wurden auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen Allergikern und gesunden Kontrollprobanden, die zu beobachtenden Veränderungen bei Allergikern *mit* gegenüber solchen *ohne* erfolgte spezifische

Immuntherapie sowie die Unterschiede von allergischen Probanden *mit* gegenüber solchen *ohne* allergisches Asthma gelegt.

Die sogenannte „heatmap“ stellt die Ausprägungsunterschiede der Genexpression zwischen zwei Gruppen dar. Dabei dient die Farbskala von blau bei niedriger Expression über grün, gelb, orange bis rot bei starker Expression zur Veranschaulichung.

Zur besseren Identifikation potenzieller Biomarker fokussierten wir die Transkriptomanalyse auf solche Faktoren, die vom Bronchialepithel in das Atemwegslumen sekretiert werden („sekretierte Mediatoren“) sowie Transkriptionsfaktoren.

Zunächst wird im Folgenden jeweils übersichtshalber die Gesamtheit der $> 1,5$ -fach erhöht bzw. erniedrigt exprimierten Gene dargestellt, dann spezifischer daraus die Gruppe der durch Anwendung der bereits beschriebenen GO-terms identifizierten sekretierten Mediatoren, von denen eine Auswahl an besonders interessanten Genen graphisch hervorgehoben und im Diskussionsteil näher beleuchtet wird.

Der „Volcano Plot“ ist eine graphische Darstellung zur Veranschaulichung der Stärke der Veränderung der Genexpression (Fold Change) und der Signifikanz im Rahmen der statistischen Analyse (p-Wert). Aufgetragen sind die jeweiligen Gene nach $-\log_{10}$ des p-Wertes (y-Achse) gegen \log_2 des Fold Changes (x-Achse).

Jeder Punkt im Volcano Plot repräsentiert ein Gen. Rot dargestellt sind hochregulierte, blau dargestellt herunterregulierte Gene, die die Kriterien für den p-Wert erfüllen. Grau dargestellt sind solche, deren p-Wert außerhalb des definierten signifikanten Bereiches ($p < 0,05$) liegt. Grün dargestellt hingegen sind die Gene, die die Kriterien des p-Werts erfüllen, die aber nur sehr schwach verändert sind, also deren Fold Change außerhalb des definierten Bereichs liegt ($FC > 1,5$).

Mithilfe des Volcano Plots ist auf einen Blick eine erste Einschätzung möglich, wie viele der Werte signifikant (je höher der Punkt, desto kleiner der p-Wert, also desto signifikanter) und wie stark die veränderte Expressierung ist (je weiter außen der Punkt liegt, desto stärker verändert ist seine Ausprägung im Vergleich zur Bezugsgruppe). Darüber hinaus können durch die Zuordnung des jeweiligen Gens zum entsprechenden Punkt besonders stark veränderte und zugleich statistisch signifikante Gene identifiziert werden, die potentiell für die weitere Analyse in besonderem Maße interessant sind.

In Abbildung 17 ist beispielhaft der Volcano Plot für den Vergleich „allergische Rhinitis vs. gesunde Probanden“ dargestellt und erläutert.

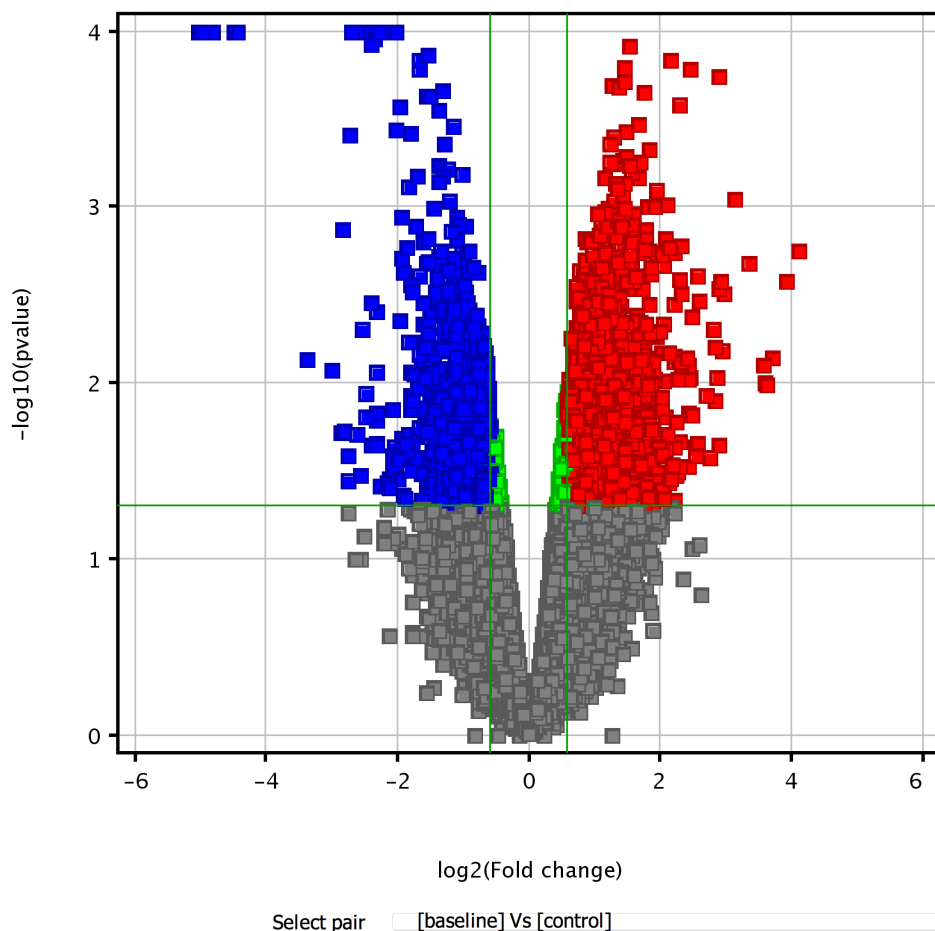


Abbildung 17: Volcano Plot für die Gegenüberstellung der Transkriptome von Probanden mit allergischer Rhinitis vs. gesunde Kontrollen

Rot dargestellt sind Gene, die bei Probanden mit Allergischer Rhinitis mehr als 1,5-fach hochreguliert sind gegenüber Kontrollprobanden bei $p < 0,05$.

Blau dargestellt sind Gene, die bei Probanden mit Allergischer Rhinitis mehr als 1,5-fach herunterreguliert sind gegenüber Kontrollprobanden bei $p < 0,05$.

Grün dargestellt sind Gene, die weniger als 1,5-fach hoch- bzw. herunterreguliert sind.

Grau dargestellt sind Gene, deren Regulation statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

3.3.1 Allergiker vs. gesunde Kontrollen

Für die Gegenüberstellung Allergiker vs. gesunde Kontrollen beschränkten wir uns in der Gruppe der Allergiker auf solche ohne SCIT, um die Ergebnisse nicht durch etwaige durch die Therapie entstandene Veränderungen zu verzerren.

In der Pollensaison (vgl. Abbildung 18) sind u. a. die für die gleichnamigen Zytokine codierenden Gene *CXCL8 = IL8* (FC: 3,3) und *CSF1* (FC: 2,2) hochreguliert, zudem das Gen für das sekretierte Protein TNFSF14 (FC: 2,0) aus der TNF-Familie und *S100A8* (FC: 2,2). Herunterreguliert sind u. a. *IFN γ* (FC: 2,7), *TGF β 2* (FC: 2,0) und das für das TNF-Familienmitglied Fas-Ligand codierende Gen *FASLG* (FC: 2,5). Außerhalb der Pollensaison

zeigt sich u. a. eine signifikante Hochregulierung der Gene *IL4* (FC: 1,7), *IL13RA2* (FC: 1,6), *IL24* (FC: 1,6), *TSLP* (FC: 1,8), *SERPINB2* (FC: 1,6) und *CLCA1* (FC: 3,2) sowie *CCL24* = *Eotaxin2* (FC: 1,6) Herunterreguliert sind u. a. *IL15RA* (FC: 2,0) und *SCGB1A1* (FC: 3,9).

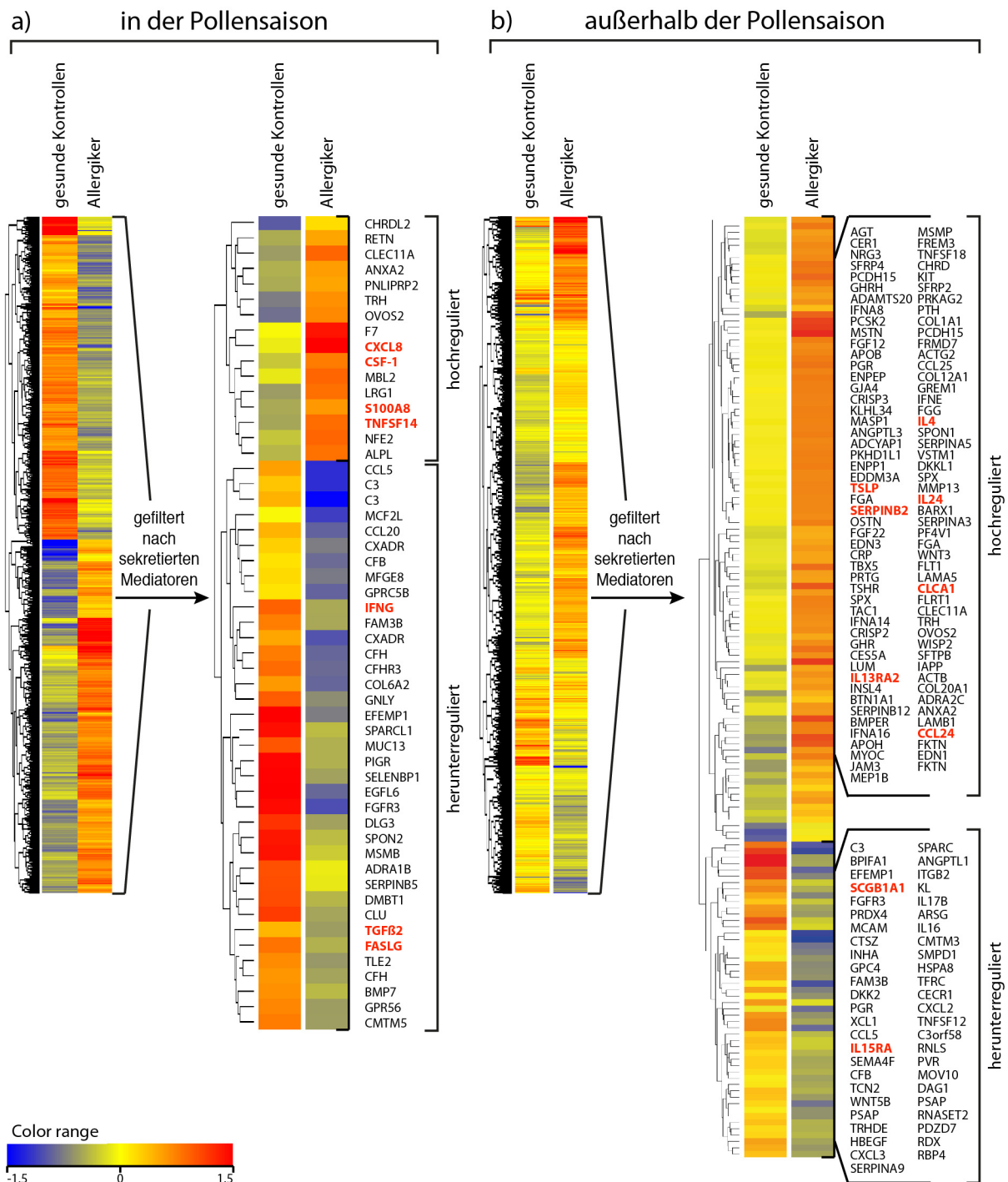


Abbildung 18: Gegenüberstellung der Transkriptome der Allergiker (mit und ohne Asthma; ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

Links jeweils die Gesamtübersicht aller stärker als 1,5-fach erhöht/vermindert exprimierten Gene, rechts daneben jeweils die heatmap für die aus dieser Gesamtheit mittels GO-terms herausgefilterten sekretierten Mediatoren. Innerhalb dieser heatmap befinden sich im oberen Abschnitt die in der zweiten Gruppe (rechte Spalte, hier: Allergiker) gegenüber der ersten Gruppe (linke Spalte, hier: gesunde Kontrollen) hochregulierten, im unteren Abschnitt die jeweils herunterregulierten Gene (sichtbar durch die Farbgebung und verdeutlicht durch die seitlichen Klammern, siehe Beschriftung). Ausgewählte Gene werden im Diskussionsteil näher beleuchtet und sind zur Hervorhebung rot gekennzeichnet.

Daneben erfolgte der Vergleich der Transkriptome bei Probanden mit allergischer Rhinitis, aber ohne Asthma gegenüber gesunden Probanden (vgl. Abbildung 19). Hier zeigt sich u. a. eine signifikante Hochregulierung der Gene *CXCL8 = IL8* (FC: 4,1), *CCR1* (FC: 1,6), *IL7* (FC: 2,5), *ICAM1* (FC: 2,1) und *S100A8* (FC: 2,4).

Außerhalb der Pollensaison zeigt sich u. a. eine signifikante Hochregulierung von *CCL24 = Eotaxin2* (FC: 1,7), *ICAM1* (FC: 2,0), *VEGFA* (FC: 2,3), *TSLP* (FC: 1,8), *CLCA1* (FC: 2,9) und *MMP9* (FC: 2,7). Herunterreguliert ist u. a. das für ein Sekretoglobin-Familienmitglied codierende Gen *SCGB1A1* (FC: 3,7) und das für das zugehörige Oberflächenprotein codierende Gen *CD9* (FC: 2,1).

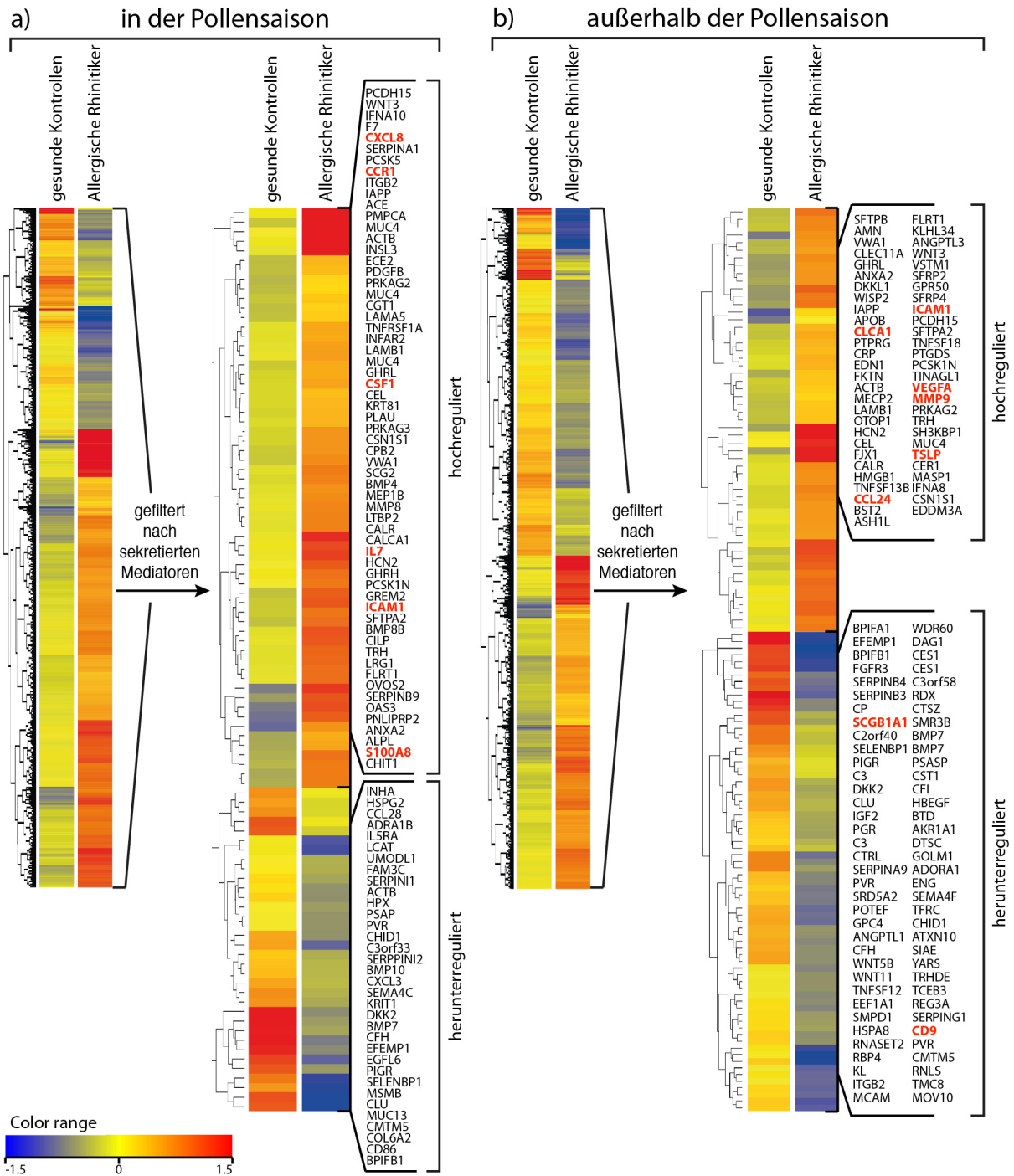


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Transkriptome der Allergiker ohne Asthma (ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

3.3.2 Allergiker mit vs. ohne Asthma

Für den Vergleich Allergiker mit (“allergische Asthmatiker”) vs. ohne Asthma (“allergische Rhinitiker”) (vgl. Abbildung 20) wurden ebenfalls nur Probanden ohne SCIT eingeschlossen, um ein klareres Bild ohne Verzerrung durch mögliche Therapieeinflüsse zu bekommen.

In der Pollensaison zeigt sich bei den Asthmatikern u. a. eine signifikante Hochregulierung von *CSF1* (FC: 1,6) gegenüber den Probanden ohne Asthma; herunterreguliert sind dagegen u. a. die Gene *CXCL9* (FC: 5,3), *CXCL11* (FC: 2,6), *CCL20* (FC: 4,3), *IFN γ* (FC: 4,0), *FASLG* (FC: 2,8), *IL12A* (FC: 1,7) und *IL15RA* (FC: 1,7), *TGF β 2* (FC: 2,2) sowie *IL-32* (FC: 2,4) und das Gen für den Androgen-Rezeptor (*AR*) (FC: 4,5).

Außerhalb der Pollensaison zeigt sich in der Gruppe der allergischen Asthmatiker u. a. eine signifikante Hochregulierung der Gene *CSF1* (FC: 2,1), *CCL1* (FC: 1,9), *IL24* (FC: 1,9), *CXCL12* (FC: 2,3), *CD86* (FC: 9,6) und *IL22RA2* (FC: 2,4) gegenüber den allergischen Rhinitikern. Herunterreguliert sind u. a. die für die entsprechenden Chemokine codierenden Gene *CCL20* (FC: 2,5) und *CXCL9* (FC: 9,6), *CXCL10* (FC: 4,0) und *CXCL11* (FC: 4,8), *CCL5* (FC: 6,6) und zudem, wie auch in der Pollensaison, *IL32* (FC: 3,4) und *IL15RA* (FC: 1,7).

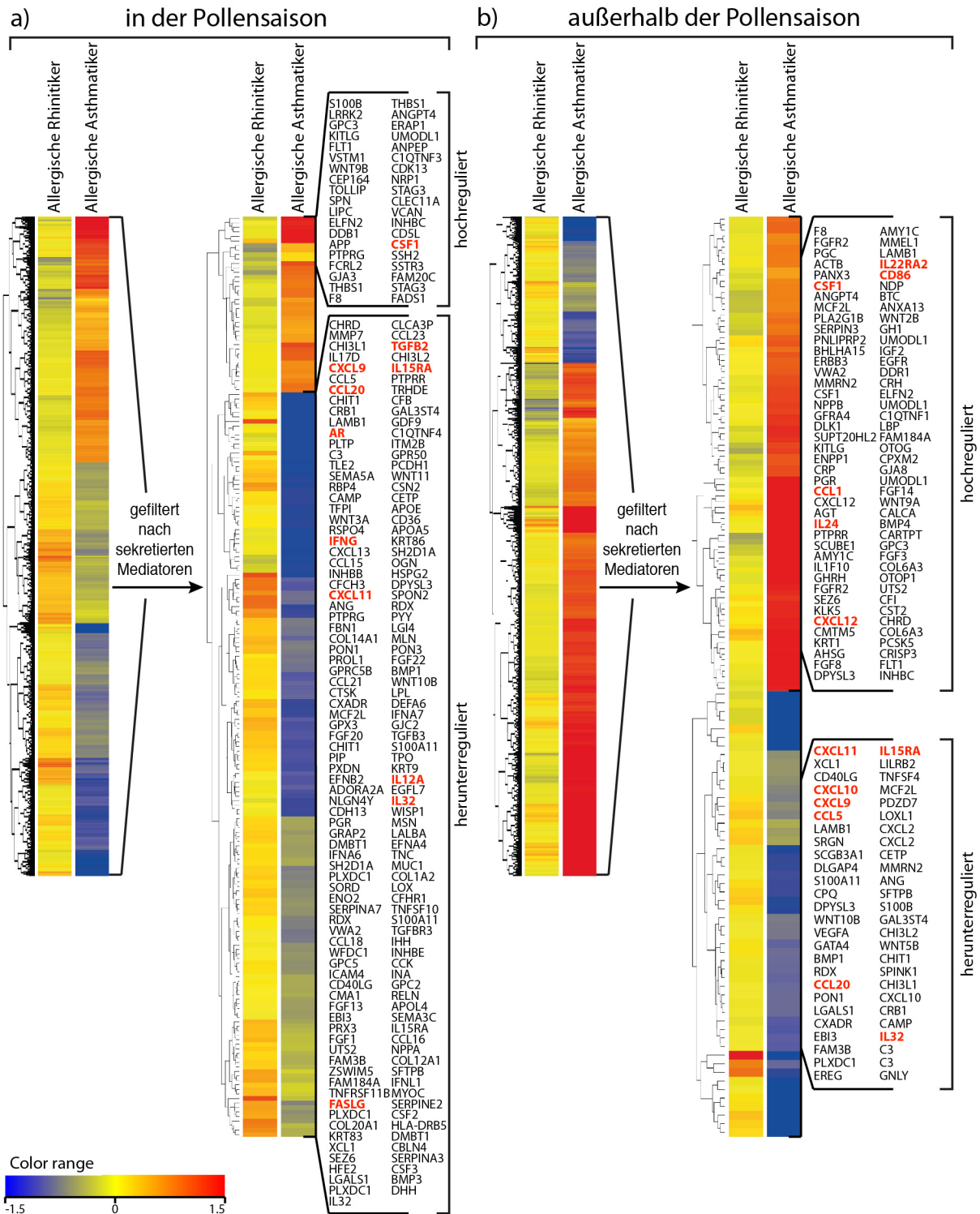


Abbildung 20: Gegenüberstellung der Transkriptome der Allergiker mit vs. ohne Asthma (jeweils ohne SCIT) in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

3.3.3 Allergiker mit vs. ohne SCIT

In der folgenden Abbildung (Abbildung 21) sind die Ergebnisse der Gegenüberstellung der Genexpression der Gruppen Allergiker *mit* vs. *ohne* spezifische Immuntherapie dargestellt. Hierbei wurde u. a. auch untersucht, welche Gene für sekretierte Mediatoren stabil in und außerhalb der Pollensaison durch die SCIT verstärkt exprimiert werden (vgl. Abbildung 21c).

In der Pollensaison (siehe Abbildung 21a) zeigt sich bei den Allergikern mit SCIT u. a. eine signifikante Hochregulierung der Gene *SCGB1A1* (FC: 2,1), *IFN γ* (FC: 2,9), *IL7* (FC: 1,7) und *IL15RA* (FC: 2,4) und des für den Androgenrezeptor codierenden Gens *AR* (FC: 3,0) gegenüber Allergikern ohne SCIT. Unter anderem herabreguliert sind *IL24* (FC: 2,0) und *CSF1* (FC: 1,8) sowie *CXCL8 = IL8* (FC: 3,8) und *TNFSF14* (FC: 2,1).

Außerhalb der Pollensaison (siehe Abbildung 21b) zeigt sich bei den Teilnehmern mit SCIT u. a. (wie auch in der Pollensaison, vgl. Abbildung 21c) eine signifikante Hochregulierung der Gene *IL15RA* (FC: 1,6), *IL7* (FC: 2,0) und *SCGB1A1* (FC: 3,3). Herabreguliert sind u. a. die Gene *IL24* (FC: 1,8), *POSTN* (Periostin, FC: 4,3), *CLCA1* (FC: 2,2), *IL13RA2* (FC: 1,8), *TNFSF14* (FC: 3,6) und *TSLP* (FC: 1,6) sowie *S100A8* (FC: 2,3).

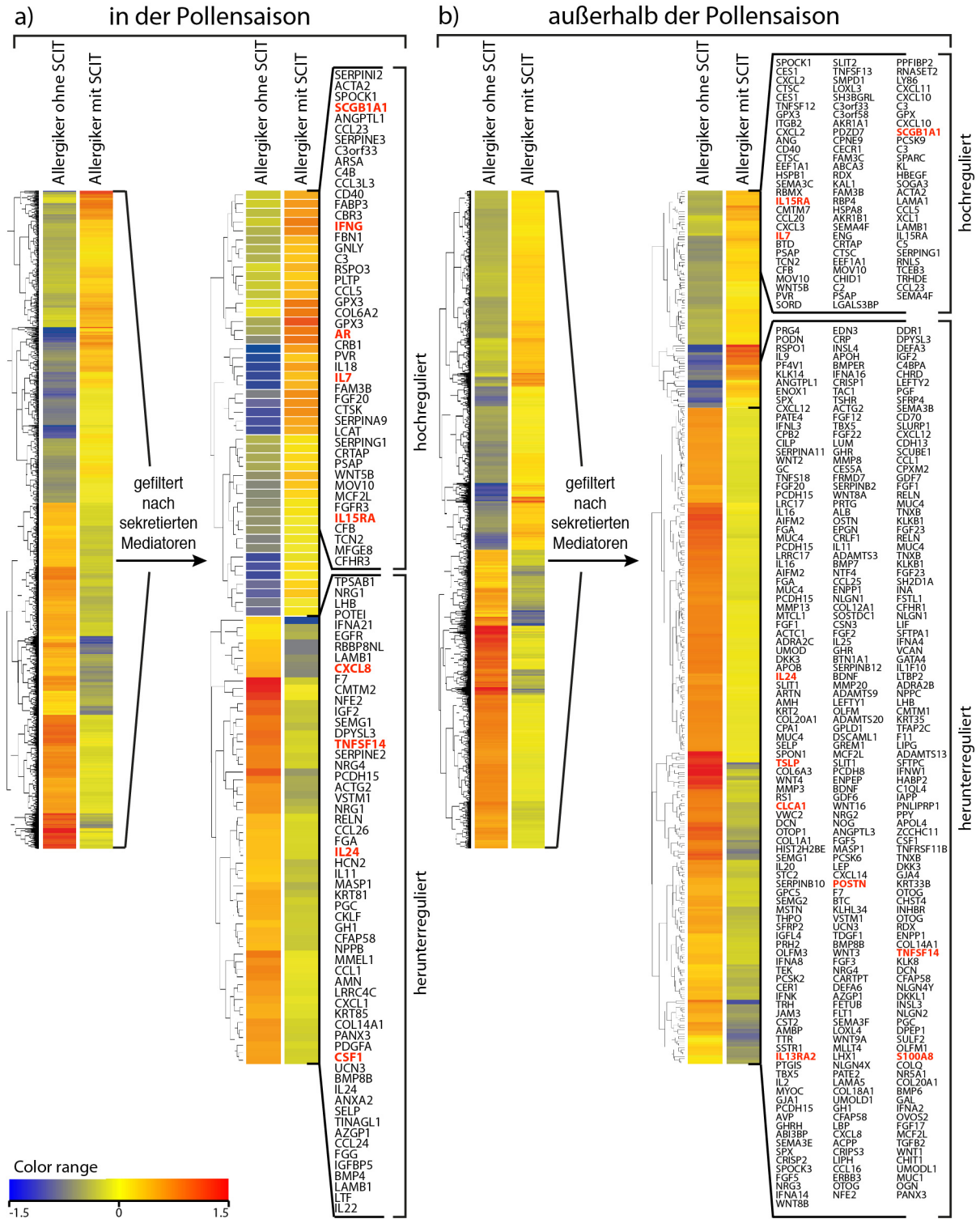


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Transkriptome der Allergiker (mit und ohne Asthma) mit SCIT vs. ohne SCIT in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

bei Allergikern mit SCIT gegenüber Allergikern ohne SCIT hochregulierte Gene

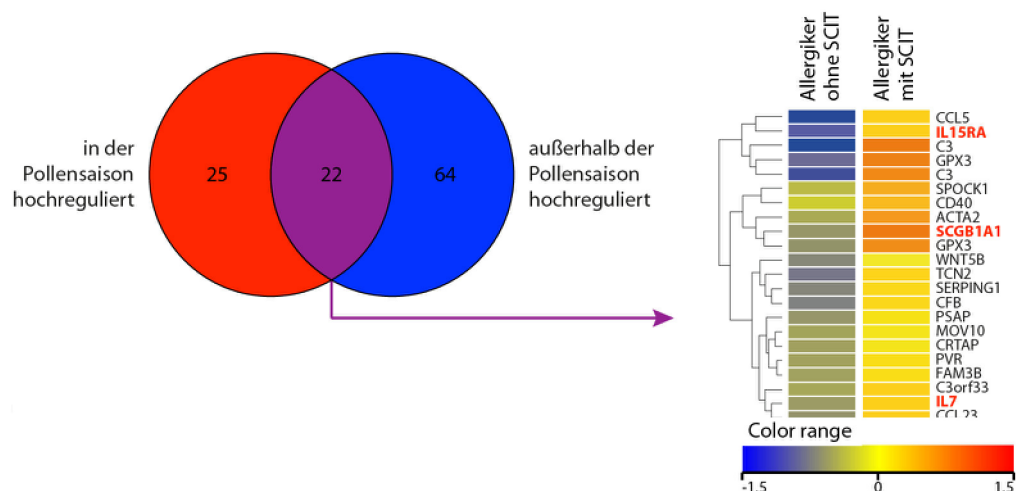


Abbildung 21 c) Durch SCIT (bei Probanden mit allergischer Rhinitis mit oder ohne Asthma) hochregulierte Gene sekretierter Mediatoren in bzw. außerhalb der Pollensaison, rechts die 22 sowohl in als auch außerhalb der Saison hochregulierten Gene von sekretierten Mediatoren

Außerdem erfolgte eine genauere Betrachtung der Veränderung der Genexpression durch die SCIT in der Subgruppe der allergischen Asthmatiker (vgl. Abbildung 22): In der Pollensaison (siehe Abbildung 22a) finden sich unter den bei Asthmatikern mit SCIT hochregulierten Genen *IFN γ* (FC: 2,9) und *SCGB1A1* (FC: 2,0). Herabreguliert bei Probanden mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT sind u. a. Gene für TH2-Zytokine wie *IL5* (FC: 4,1) und *IL13* (FC: 3,4) sowie für weitere an der allergischen Entzündung beteiligte Zyto- und Chemokine wie *IL17A* (FC: 2,7) und *IL17F* (FC: 2,0), *IL24* (FC: 3,0), *IL16* (FC: 2,6), *CXCL8 = IL8* (FC: 2,8) und *CCL1* (FC: 2,6), zudem *IL22RA2* (FC: 2,3), *IL5RA* (FC: 3,0), *CCL26* (FC: 4,6) und Inhibin A (*INH A*) (FC: 2,4). Außerhalb der Pollensaison (siehe Abbildung 22b) sind bei Probanden mit SCIT u. a. die Gene *IL15RA* (FC: 2,7), *IL7* (FC: 2,5) und die für die entsprechenden Chemokine codierenden Gene *CXCL9* (FC: 12,8), *CXCL10* (FC: 8,0) und *CXCL11* (FC: 25,0) hochreguliert. Vermindert exprimiert sind dagegen u. a. die Gene für die entsprechenden Zytokine *IL17A* (FC: 3,4), *IL19* (FC: 4,4), *IL24* (FC: 2,4), *IL2* (FC: 2,1), *IL20* (FC: 2,9), *IL13RA2* (FC: 2,1), *IL22RA2* (FC: 4,2); zudem *ADAMTS4* (FC: 2,4), *CCL1* (FC: 2,2) und *POSTN* (Periostin, FC: 7,0).

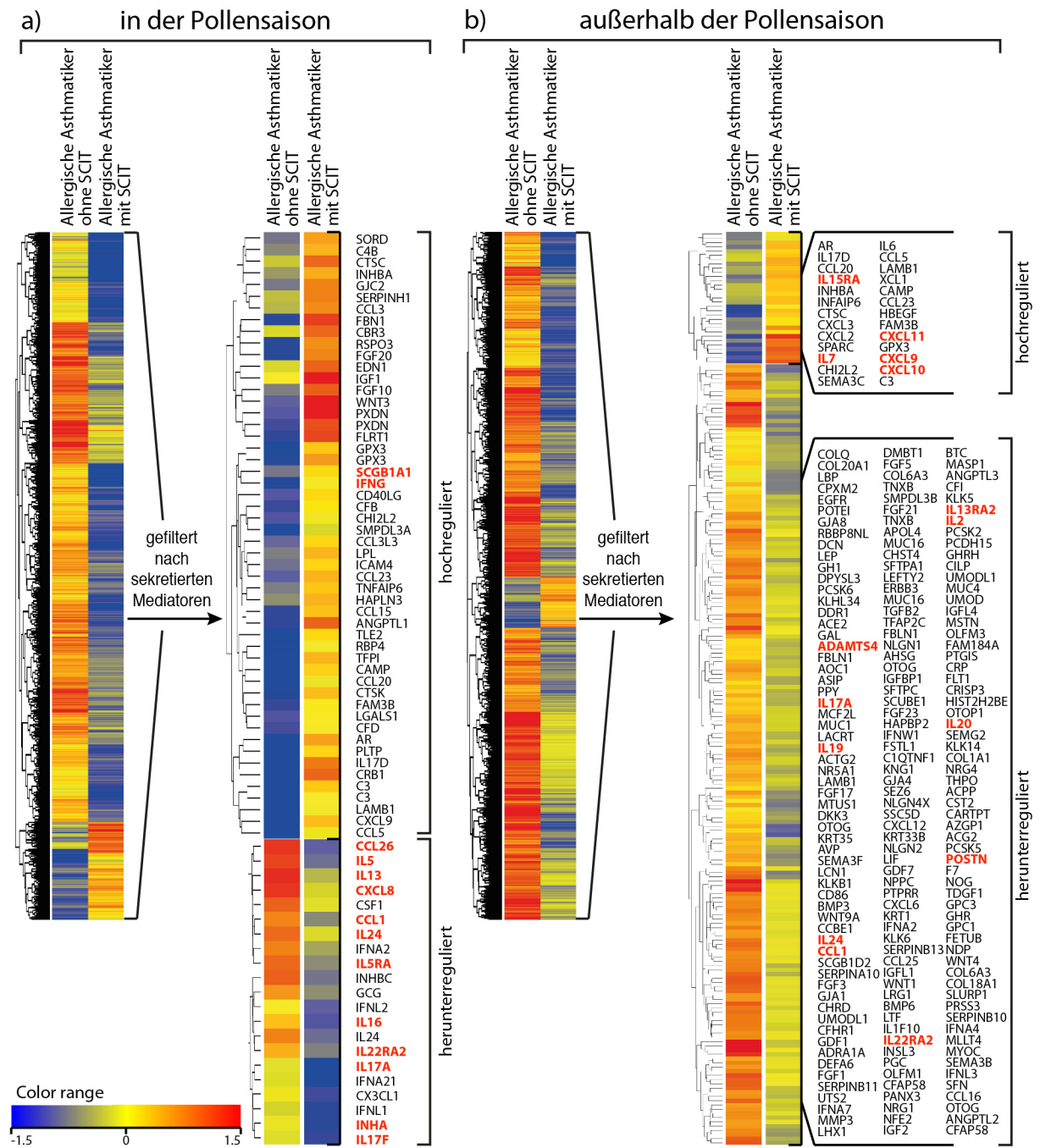


Abbildung 22: Gegenüberstellung der Transkriptome der allergischen Asthmatiker mit vs. ohne SCIT in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

3.3.4 Transkriptionsfaktoren

Durch Anwendung entsprechender GO-terms (vgl. Abschnitt 2.5.2) erfolgte zudem die Analyse der Genexpressionsunterschiede in den jeweiligen Subgruppen in Bezug auf die Transkriptionsfaktoren.

In der Gegenüberstellung der Transkriptionsfaktoren bei Allergikern vs. gesunden Kontrollprobanden (vgl. Abbildung 23) zeigte sich u. a. das Gen für *TCF7* (FC: 2,1) in der Pollensaison bei Allergikern signifikant herabreguliert.

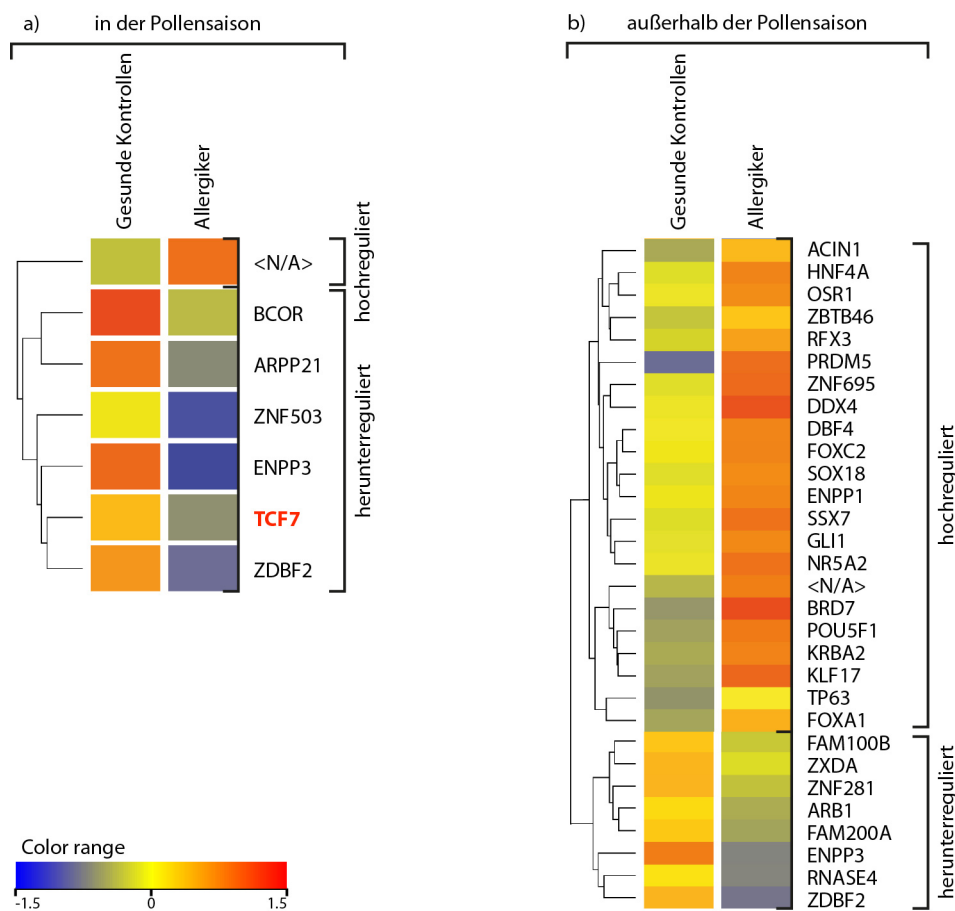


Abbildung 23: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern (mit und ohne Asthma, ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

In der Subgruppe der Probanden mit allergischer Rhinitis vs. gesunde Kontrollprobanden (siehe Abbildung 24) war in der Pollensaison bei allergischen Rhinitikern u. a. *TFE3* (FC: 1,6) hoch – und außerhalb der Pollensaison *PPARG* (FC: 1,7) herunterreguliert im Vergleich zu Kontrollprobanden.

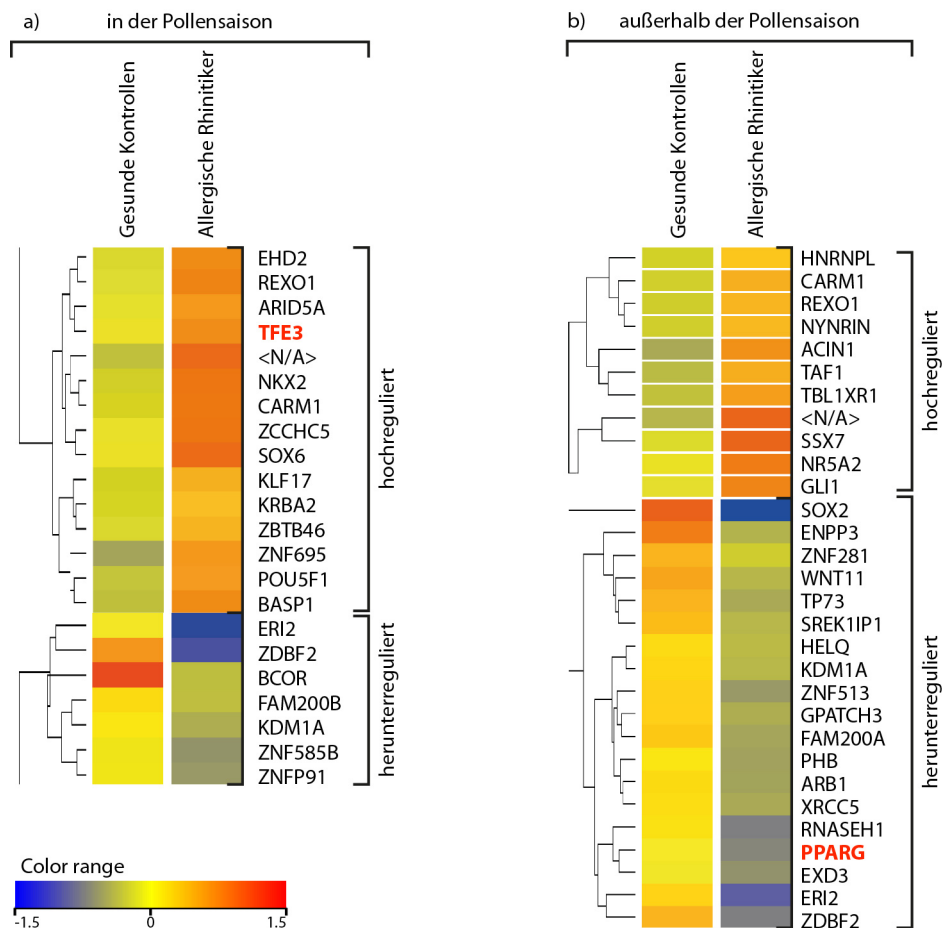


Abbildung 24 Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern ohne Asthma (ohne SCIT) vs. gesunde Kontrollen in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

Auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren erfolgte die Gegenüberstellung Allergiker *mit* vs. *ohne* Asthma:

Wie in Abbildung 25 ersichtlich, ist im Vergleich Allergiker mit vs. ohne Asthma in der Pollensaison bei Asthmatikern u. a. das Gen *TBX21* (FC: 2,6) signifikant herabreguliert, außerhalb der Pollensaison ist das Gen *FOXI1* (FC: 3,2) hoch – und *TCF3* (FC: 1,9) herunterreguliert gegenüber Nicht-Asthmatikern.

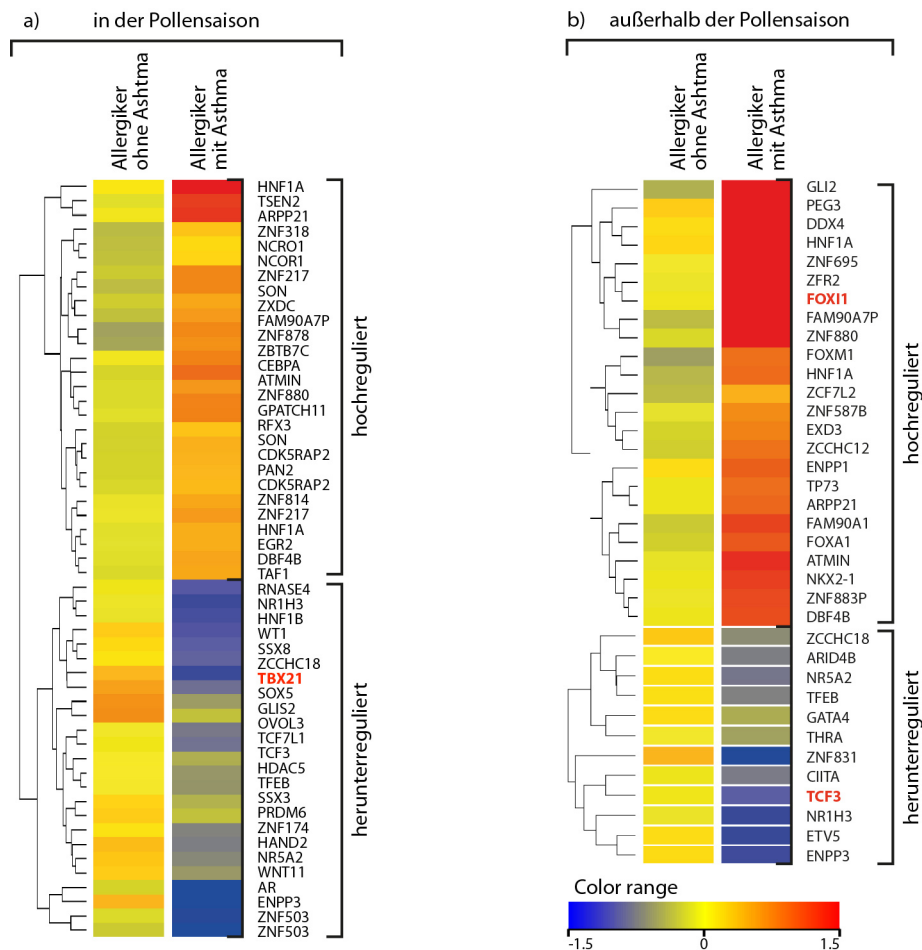


Abbildung 25: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern mit vs. ohne Asthma in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

Der Vergleich „mit vs. ohne SCIT“ wurde zum einen für die Gesamtgruppe der Allergiker durchgeführt, zum anderen für solche mit Asthma: In Abbildung 26 wird veranschaulicht, welche Gene für Transkriptionsfaktoren bei Allergikern (mit und ohne Asthma) *mit vs. ohne* SCIT in (u.a. *TCF7* (FC: 2,1)) bzw. außerhalb der Saison (u.a. *SMAD6* (FC: 1,6) und *PPARG* (FC: 1,7)) bei Probanden mit SCIT hochreguliert sind.

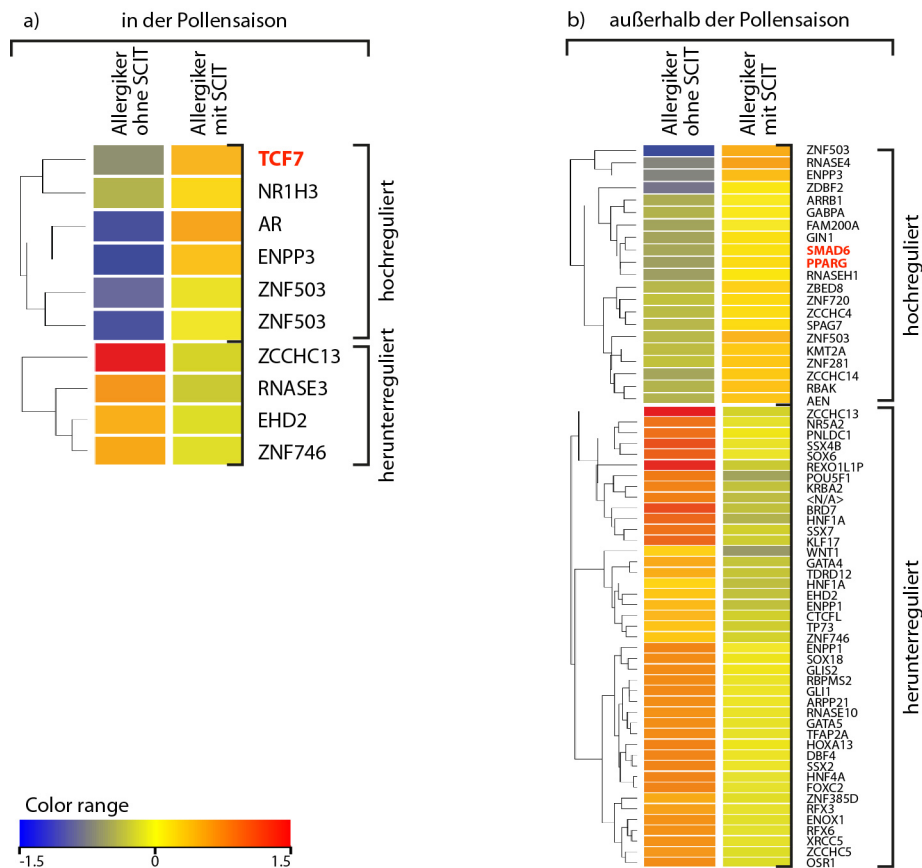


Abbildung 26: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von Allergikern (mit und ohne Asthma) mit vs. ohne SCIT in der Pollensaison (a) bzw. außerhalb der Pollensaison (b)

In der Subgruppe der allergischen Asthmatiker mit vs. ohne SCIT (siehe Abbildung 27) zeigt sich außerhalb der Pollensaison bei Asthmatikern mit SCIT u.a. eine verstärkte Expression der Gene *TCF3* (FC: 2,3), *TCF7* (FC: 2,0) und *TCF12* (FC: 2,7), dagegen sind die Gene *FOXJ1* (FC: 6,4) und *FOXM1* (FC: 2,4) bei Asthmatikern mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT vermindert exprimiert.

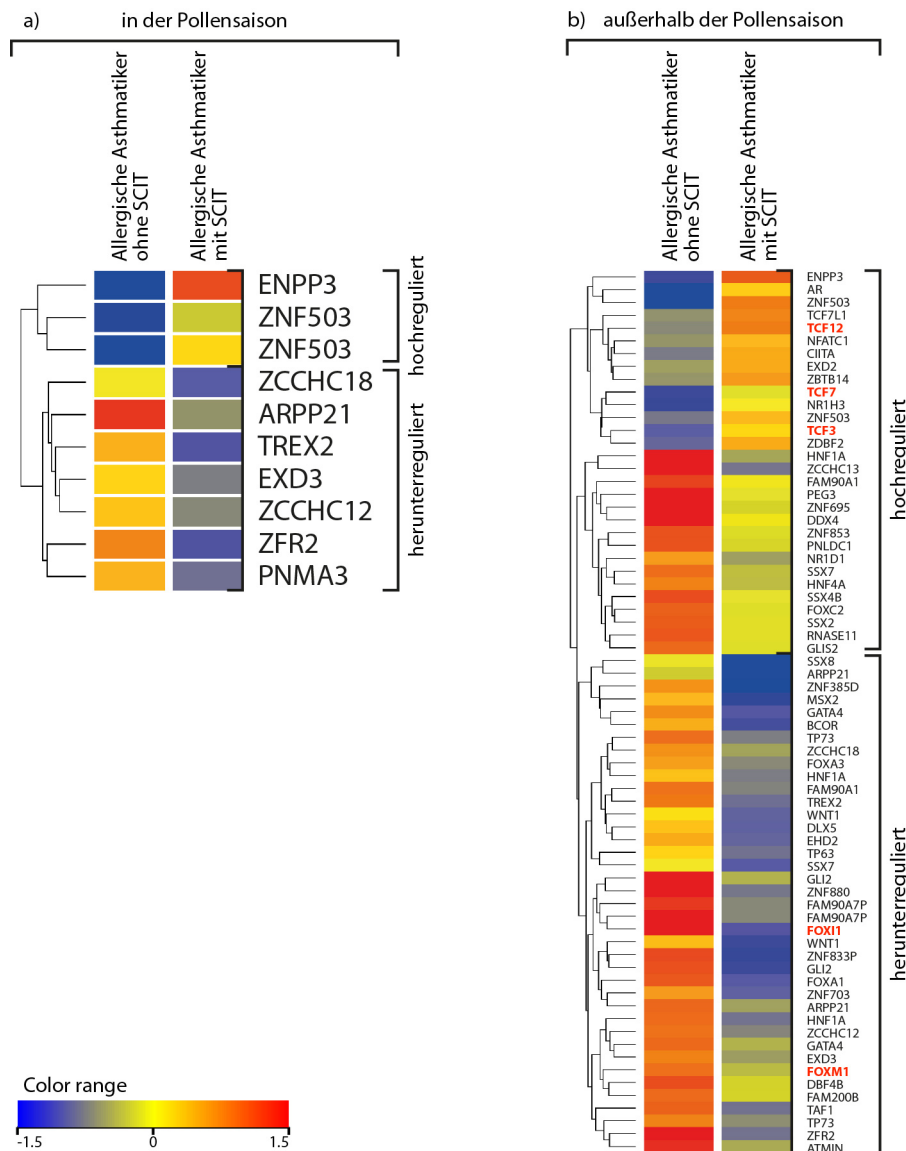


Abbildung 27: Regulation der Gene für Transkriptionsfaktoren von allergischen Asthmatikern mit vs. ohne SCIT in (a) bzw. außerhalb (b) der Pollensaison

3.4 qPCR- Validierung

Für ausgewählte Gene der Microarrayanalyse mit Potential für Biomarker erfolgte zur Validierung die Durchführung einer qRT-PCR nach der im Kapitel „Material und Methoden“ (vgl. Abschnitt 2.5.3 Real-time qPCR) beschriebenen Weise durchgeführt. Hierbei zeigten sich für *SCGB1A1* signifikant höhere Werte bei Probanden mit allergischer Rhinitis mit SCIT gegenüber denjenigen ohne SCIT innerhalb ($p = 0,041$) und außerhalb ($p = 0,001$) der Pollensaison (vgl. Abbildung 28, Abbildung 29). Bei der Subgruppe der Probanden mit allergischem Asthma zeigte sich im Trend das selbe Ergebnis, in der Pollensaison mit statistischer Signifikanz ($p = 0,048$), außerhalb der Pollensaison oberhalb des statistischen Signifikanzniveaus ($p = 0,5179$).

IL24 dagegen zeigte sich sowohl in als auch außerhalb der Saison bei Patienten mit allergischer Rhinitis ebenso wie in der Subgruppe der Patienten mit allergischem Asthma mit SCIT gegenüber den entsprechenden Vergleichsgruppen ohne SCIT statistisch signifikant erniedrigt (allergische Rhinitis mit vs. ohne SCIT in der Pollensaison: $p = 0,030$, außerhalb der Pollensaison: $p = 0,015$, allergisches Asthma mit vs. ohne SCIT in der Pollensaison: $p = 0,026$, außerhalb der Pollensaison: $p = 0,043$). *CCL20* zeigte sich tendenziell bei Allergikern ohne SCIT in und außerhalb der Pollensaison geringer exprimiert, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

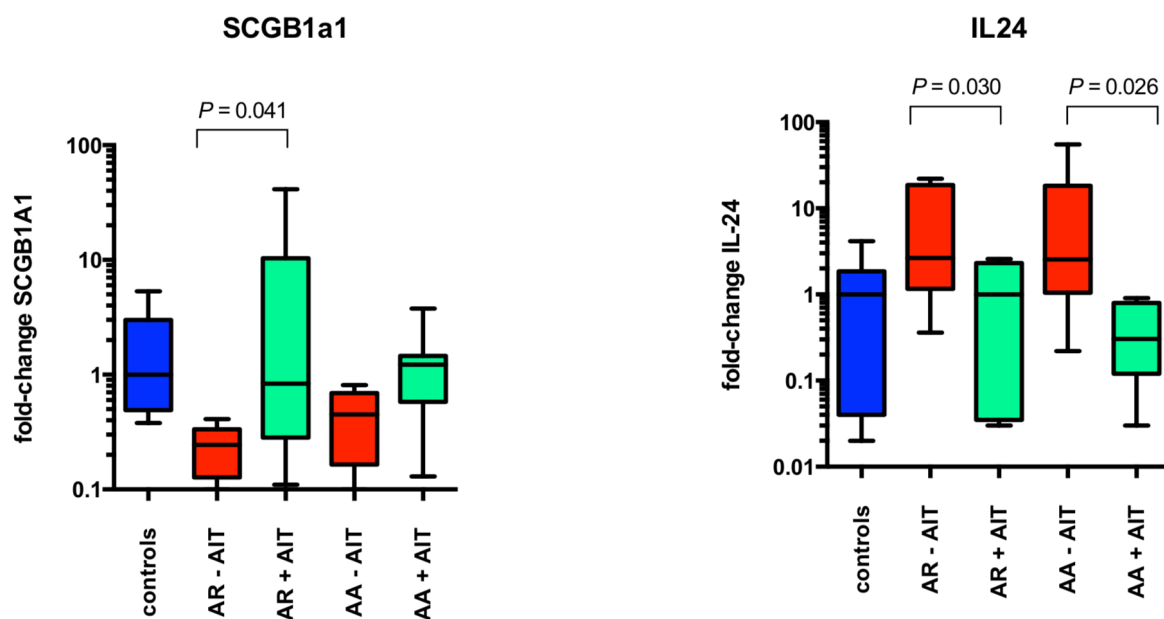


Abbildung 28: qPCR *SCGB1A1*, *IL24* in der Pollensaison

Anmerkung: „controls“ = Kontrollprobanden (blaue Farbgebung), „AR“ = Probanden mit allergischer Rhinitis, „AA“ = Probanden mit allergischem Asthma, „-AIT“ = ohne SCIT (rote Farbgebung), „+AIT“ = mit SCIT (grüne Farbgebung).

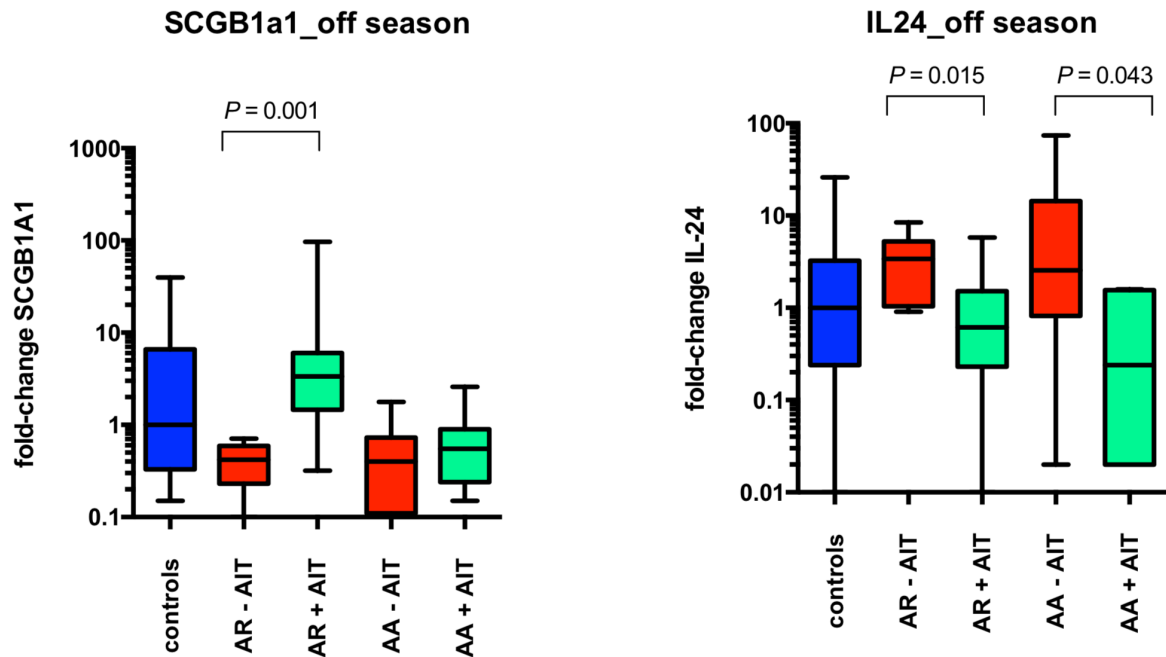


Abbildung 29: qPCR *SCGB1A1*, *IL24* außerhalb der Pollensaison

3.5 Messung der Proteinspiegel

In der Messung der Proteinspiegel mittels Elektrochemilumineszenz (MSD Mesoscale) zeigten sich Unterschiede bei ausgewählten Zyto- bzw. Chemokinen:

CCL26 (Eotaxin-3) und IL-5 waren bei Probanden mit allergischer Rhinitis mit durchgeführter SCIT erniedrigt gegenüber solchen ohne SCIT (mit $p = 0,056$ jeweils statistisch knapp oberhalb der Signifikanzgrenze, vgl. Abbildung 30 bzw. Abbildung 31)

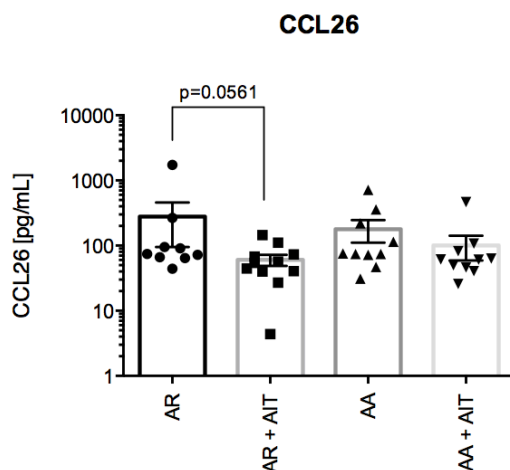


Abbildung 30: Mesoscale-Messung CCL26
Anmerkungen: AR = Probanden mit allergischer Rhinitis, AA = Probanden mit allergischem Asthma, AIT = SCIT

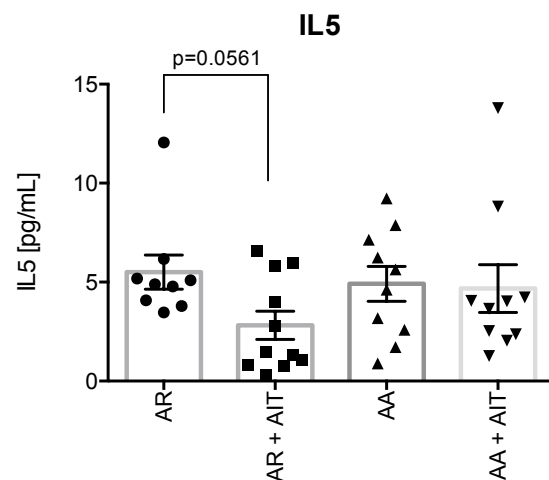


Abbildung 31: Mesoscale-Messung IL-5
Anmerkungen: AR = Probanden mit allergischer Rhinitis, AA = Probanden mit allergischem Asthma, AIT = SCIT

Das proinflammatorische Zytokin IL-8 zeigte sich sowohl in der Subgruppe der Probanden mit als auch ohne Asthma jeweils erniedrigt bei Probanden mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT. In der Subgruppe der Probanden mit allergischer Rhinitis war der Unterschied statistisch signifikant ($p < 0,05$), vgl. Abbildung 32.

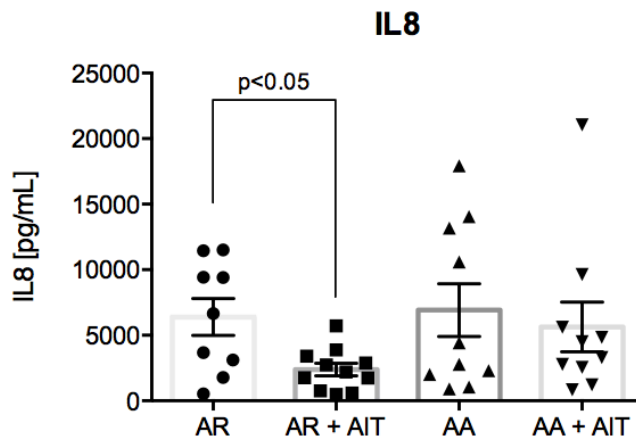


Abbildung 32: Mesoscale-Messung IL-8

Anmerkungen: AR = Probanden mit allergischer Rhinitis, AA = Probanden mit allergischem Asthma, AIT = SCIT

Darüber hinaus zeigte sich eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen SCGB1A1 und CCL26 sowie zwischen SCGB1A1 und IL-5 (vgl. Abbildung 33.).

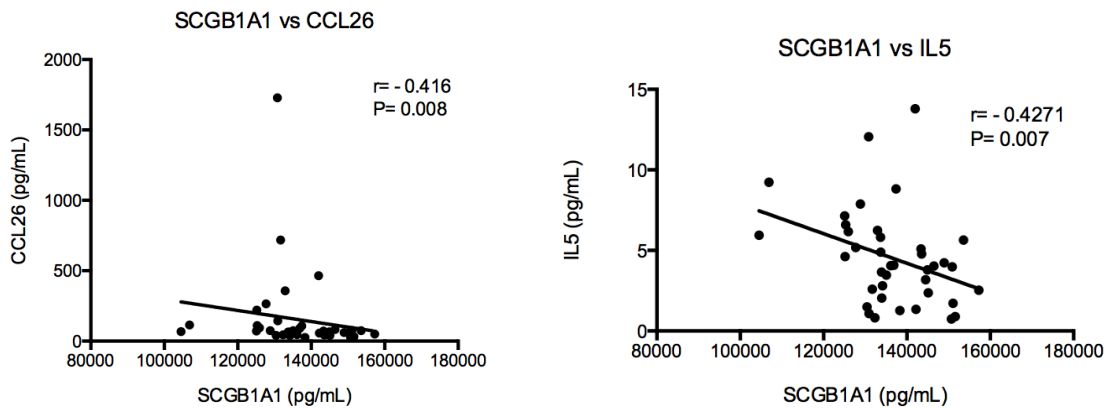


Abbildung 33: inverse Korrelation zwischen SCGB1A1 und CCL26 bzw. IL-5

Bei der Korrelation der Proteinspiegel mit klinischen Daten ergab sich eine positive Korrelation ($r = 0,387$, $p = 0,018$) zwischen dem IL-24-Proteinspiegel und dem Ergebnis des RQLQ-Fragebogens in der Pollensaison, wohingegen die SCGB1A1-Proteinspiegel in der Pollensaison negativ mit den Ergebnissen des RQLQ-Fragebogens korrelierten ($r = -0,356$, $p = 0,031$; vgl. Abbildung 34).

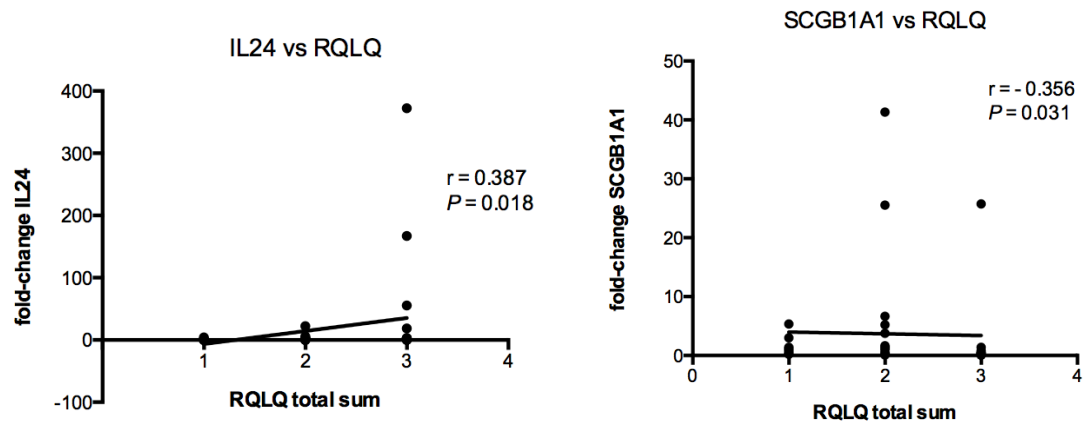


Abbildung 34: Korrelationen zwischen IL-24 bzw. SCGB1A1 und RQLQ

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Daten

Lungenfunktion

Die Auswertung der erhobenen Daten der Lungenfunktionsprüfung belegt eine signifikante Einschränkung bei Probanden mit Asthma gegenüber Nicht-Asthmatikern (erniedrigter Tiffeneau-Index sowie MEF25% und MEF50% bzw. erniedrigter FEV1%) und untermauert somit die anamnestisch erhobenen Angaben bzw. die Einteilung der Probanden in die entsprechenden Subgruppen. Die Parameter MEF25% bzw. MEF50% gelten dabei als repräsentativ für die Obstruktion der kleinen Atemwege. Dass sich auch bei unseren Studienteilnehmern mit Asthma sehr gute FEV1-Werte zeigen, kann durch die gute klinische Kontrolle des Asthmas bei diesen Probanden erklärt werden (vgl. GINA-Score).

RQLQ und PSQ

Die Ergebnisse des Mini-RQLQ in unserer Studie legen eine eingeschränkte Lebensqualität der Allergiker gegenüber den Nicht-Allergikern nahe, insbesondere in der Pollensaison, und demonstrieren damit den Einfluss der Erkrankung auf Alltagsleben und Psyche auch bei unseren Probanden.

Zudem zeigt sich eine deutlich geringere Ausprägung dieser Einschränkung der Lebensqualität bei Allergikern, die mit einer SCIT therapiert worden sind. Dies untermauert die Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie und die Steigerung der Lebensqualität bei behandelten Patienten gegenüber solchen ohne SCIT.

Im PSQ, einem validierten Fragebogen zur Stresswahrnehmung (Fliege et al., 2005; Levenstein et al., 1993) hingegen konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in den Probandengruppen nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine entsprechenden Studien zu möglichen Korrelationen zwischen PSQ-Score und Allergischer Rhinitis bzw. Asthma.

GINA-Score

Die Auswertung der erhobenen Daten bezüglich der Schwere und Kontrolliertheit der asthmatischen Symptome zeigte trotz der Tatsache, dass bei der Mehrheit der Betroffenen das Asthma kontrolliert war, einen Unterschied in-season gegenüber out-of-season: In der Pollenflugsaison ergaben sich höhere GINA-Scores als in der Winter-Visite (statistisch nicht

signifikant), es kam also, wie es bei allergischem Asthma zu erwarten ist, in der Zeit des Pollenflugs zu einer Verschlechterung der Symptomatik (vgl. Abbildung 9).

Gesamt-IgE

Das erhöhte Gesamt-IgE bei Probanden mit Allergien ist konsistent mit den Erwartungen. Wie auch in der Literatur beschrieben (Renz et al., 2010), ist bei unserem Probanden mit schwerer Atopischer Dermatitis das Gesamt-IgE besonders deutlich erhöht (> 5.000 kU/l), auch im Vergleich zu den anderen Allergikern.

Die Aussagekraft des Gesamt-IgE-Wertes ist jedoch begrenzt; so ist weder ein hoher Wert beweisend für das Vorliegen einer Atopie, noch ein niedriger Wert zum Ausschluss einer Atopie geeignet (Renz et al., 2010).

Zellzählung

Sowohl in als auch außerhalb der Pollensaison zeigen sich für Allergiker niedrigere Makrophagen- und höhere Neutrophilen-, Lymphozyten-, Eosinophilen- und Basophilenzahlen im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollprobanden (vgl. Tabelle 6), mit statistischer Signifikanz bei den Eosinophilenzahlen in und außerhalb der Saison. Die Korrelation zwischen Eosinophilenzahl und GINA-Score bei allergischen Asthmatikern in der Pollensaison unterstreicht die klinische Relevanz der Zellzahlerhebung.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der Transkriptomanalyse

4.2.1 Allergiker vs. gesunde Kontrollen

4.2.1.1 Allergiker (mit und ohne Asthma) ohne SCIT vs. gesunde Kontrollen

Um Rückschlüsse auf die Genexpression bei Allergikern im Vergleich zu gesunden Probanden zu ziehen, stellten wir die Transkriptome von nicht mit SCIT vorbehandelten Probanden mit allergischer Rhinitis und/oder allergischem Asthma bronchiale denen der nicht-allergischen Kontrollprobanden gegenüber (vgl. Abbildung 18).

In der Pollensaison (vgl. Abbildung 18a) zeigte sich hier unter anderem bei den Allergikern eine erhöhte Exprimierung von *CXCL8 = IL8*, das chemotaktisch auf Neutrophile wirkt. Neutrophile Granulozyten setzen im Rahmen der Entwicklung des allergischen Asthmas viele Entzündungsmediatoren frei und tragen durch Produktion von Faktoren wie Metalloproteinasen (z. B. MMP-9), Elastase, Lactoferrin und Myeloperoxidase zur

asthmatischen Reaktion bei (Monteseirin, 2009). Die klinische Relevanz wird u. a. darin deutlich, dass die Neutrophilie in den Atemwegen bei allergischen Atemwegserkrankungen mit der Schwere der Atemwegsobstruktion zu korrelieren scheint (Park et al., 2006). Für die Migration der Neutrophilen aus dem Kreislaufsystem zu den Atemwegen ist IL-8 maßgeblich. In der Literatur wird eine erhöhte IL-8-Gen- sowie Proteinexpression bei Asthmatikern im Bronchialepithel bzw. erhöhte IL-8-Level in bronchoalveolärer Lavage beschrieben (Marini et al., 1992; Nocker et al., 1996). Die verstärkte Genexpression konnte hier nun auch im Sputum gezeigt werden. Insbesondere wenige Stunden nach Allergenexposition scheint es bei Betroffenen zum Anstieg von IL-8 und der lokalen Neutrophilenzahl zu kommen (Nocker et al., 1996), was erklären könnte, warum in unserer Analyse die vermehrte *IL8*-Expression in der Pollensaison (bei entsprechender Exposition) signifikant nachweisbar ist, außerhalb der Saison jedoch nicht.

CSF-1 (Colony-stimulating-factor-1, M-CSF) hat essentielle Funktionen für Wachstum, Überleben und Differenzierung von Monozyten/Makrophagen und Dendritischen Zellen. Diese sind als Antigen-präsentierende Zellen gleichsam die Initiatoren der Immunantwort bei der allergischen Reaktion, sodass die Hochregulation der *CSF1*-Genexpression bei Allergikern gegenüber Kontrollprobanden stimmig erscheint. Außerdem wird durch CSF-1 auf Monozyten die Expression des extrazellulären P2X7- ATP-Rezeptors hochreguliert (Zhang et al., 2005), der die inflammatorische Wirkung der Dendritischen Zellen und Makrophagen so reguliert, dass die Entwicklung einer TH2-Antwort gegenüber einer TH1-Antwort favorisiert wird (la Sala et al., 2003). Insofern könnte die vermehrte Expression von *CSF1* in der Gruppe der Allergiker möglicherweise auch mit einer TH2-Prädominanz bei allergischen Probanden im Zusammenhang stehen. Darüber hinaus ist der CSF-1-Rezeptor insofern von besonderem Interesse im Rahmen der Asthma-Forschung, als Gen-Polymorphismen mit der Entwicklung des allergischen Asthmas in Verbindung gebracht werden (Shin et al., 2010).

Unter den hochregulierten Genen war auch *S100A8*. Das zugehörige Calcium-bindende Protein kommt in hohen Konzentrationen im Zytosol von Neutrophilen und Monozyten und bei Inflammation extrazellulär vor (Ryckman et al., 2003) und induziert die Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-6, das u. a. antiapoptotisch auf T-Lymphozyten wirkt, das für Neutrophile chemotaktische IL-8, und IL-1 β , das auf Neutrophile stimulierend wirkt und wiederum die IL-6-Freisetzung triggert (Simard et al., 2013). Zudem ist über *S100A8* von einer stimulierenden Rolle im Rahmen der Immunantwort beim Bäckerasthma berichtet worden (Pham et al., 2015). Auch scheint *S100A8* neben

S100A9 und S100A12 maßgeblich an der Induktion der Produktion von MUC5AC in Atemwegs-Epithelzellen beteiligt zu sein (Kang et al., 2015) - ein wichtiges Atemwegs-Muzin, das auch für die bronchiale Hyperreagibilität eine wichtige Rolle spielt (Evans et al., 2015) - und somit eng in Zusammenhang mit der Schleim-Überproduktion beim Asthma bronchiale zu stehen.

Zudem fällt die erhöhte Expression von *TNFSF14* (= *LIGHT*) auf, von dem gezeigt worden ist, dass es das Zytokin TSLP (= thymic stromal lymphopoietin) in bronchialen Epithelzellen hochreguliert (Herro et al., 2015). Außerhalb der Pollensaison ist bei den allergischen Probanden auch *TSLP* selbst verstärkt nachzuweisen. TSLP wird u. a. von Epithelzellen gebildet und aktiviert und spielt eine Rolle in der frühen Phase der TH2-Entzündung, insbesondere der Infiltration bzw. Funktion von Eosinophilen und ILC2-Lymphozyten (Miljkovic et al., 2014). Es bewirkt die Ausreifung Dendritischer Zellen und reguliert unter anderem den OX-40-Ligand hoch, was wiederum den Dendritischen Zellen ermöglicht, naive CD4+ T-Zellen zur Differenzierung zu TH2-Zellen zu stimulieren (West et al., 2012). TH2-assoziierte Zytokine wie IL-4 oder IL-13 wiederum induzieren die TSLP-Expression (Kato et al., 2007). In einer Studie von Ying et al. zeigte sich, dass die Anzahl *TSLP*-mRNA-exprimierender Zellen im bronchialen Epithel und der Submucosa bei Asthmatikern im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht ist, wobei die TSLP-Konzentrationen mit erhöhter TH2-Antwort und Schwere der Erkrankung korrelieren (Ying et al., 2005).

TSLP gilt darüber hinaus als bedeutender Effektor der Fibrosierung der Lunge, auch im Rahmen des allergischen Asthmas, wo es in hohen Konzentrationen zu finden ist (Herro et al., 2015). Ihm wird mittlerweile eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese des allergischen Asthmas zugeschrieben. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Überexpression von TSLP in der Lunge zur Entwicklung einer schweren Atemwegsentzündung und bronchialer Hyperreagibilität führt (Zhou et al., 2005).

Die erhöhten *TNFSF14*- bzw. *TSLP*- mRNA-Level im Sputum bei Allergikern gegenüber Kontrollprobanden passen insofern sehr gut zu diesen Annahmen.

Außerhalb der Pollensaison (vgl. Abbildung 18b) sind mit hochreguliertem *IL4* und *IL13RA2* typische Zeichen einer TH2-Dominanz bei den Allergikern erkennbar. Dies ist konsistent mit anderen Untersuchungen zur Regulation dieser Zytokine in bronchialem Sputum, die erhöhte *IL4*- und *IL13*-mRNA-Expression bei Asthmatikern nachwies (Truyen et al., 2006). Anders als erwartet, ließen sich diese Veränderungen interessanterweise in der Pollensaison nicht darstellen. Bezüglich IL-4 ist jedoch auch in anderen Studien eine derartig unterschiedliche

Expression in bzw. außerhalb der Pollensaison aufgefallen, etwa ein gegenüber gesunden Kontrollen verminderter nasaler IL-4-Spiegel bei Probanden mit allergischer Rhinitis in der Saison gegenüber erhöhtem IL-4-Spiegel nach einmaliger nasaler Allergenprovokation außerhalb der Saison (Baumann et al., 2013).

Dazu passt das hier bei Allergikern ebenfalls hoch exprimierte Gen für IL-24, welches von IL-4 hoch und von IFN- γ herunterreguliert wird. In der Literatur ist es bereits im Blut und im nasalen Sekret, nicht jedoch im Sputum erhöht nachgewiesen und hierbei als möglicher Biomarker für die Inflammation und TH2-Polarisierung des Atemwegsepithels charakterisiert worden (U. M. Zissler et al., 2016).

Ähnlich lässt sich die erhöhte Genexpression von *CLCA1* (codierend für einen Chloridkanal) und *SerpinB2* (codierend für ein Mitglied der Serpin-Proteasen) bei Allergikern interpretieren: Woodruff et al. beschrieben *CLCA1* und *SerpinB2* als spezifisch bei Asthmatikern verstärkt induzierte epitheliale Gene, die durch IL-13 reguliert werden und somit als Surrogatmarker für TH2-geführte Atemwegsentszündung dienen (Woodruff et al., 2007; Woodruff et al., 2009).

CCL24 (= *Eotaxin2*) war ebenfalls in unserer Analyse out-of-season bei den Allergikern erhöht. Diesem Chemokin wird eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und Aktivierung von Eosinophilen im allergischen Asthma zugeschrieben. Darüber hinaus könnte CCL24 durch Stimulation der Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese auch beim sogenannten Remodeling der Atemwege eine Rolle spielen (Kohan et al., 2010).

Erhöhte *Eotaxin2*-mRNA in bronchoalveolärer Lavage bzw. Atemwegsepithel- Abbürstungen bei Asthmatikern wurden bereits nachgewiesen und korrelierten hier mit Sputum-Eosinophilenzahl, Schweregrad und Kontrolliertheit des Asthmas (erniedrigtem FEV1 und vermehrten Asthmaexazerbationen) (Coleman et al., 2012). Unsere Ergebnisse zeigen, dass *Eotaxin2*-mRNA auch auf wenig invasive Art, im induzierten Sputum, bei Allergikern vermehrt nachweisbar ist.

Vermindert exprimiert war in-season bei Allergikern *IFN γ* . Auch dies ist konsistent mit vorherigen Untersuchungen, die relativ höhere *IFN γ* -mRNA-Expression in der PCR auch im Sputum von gesunden Kontrollen gegenüber Asthmatikern nachweisen konnten (Truyen et al., 2006).

Die bei Allergikern verminderte Genexpression von *IL15RA*, das mit TH1-führenden Lungenerkrankungen assoziiert ist (Muro et al., 2001), kann als weiteres Beispiel für die Verschiebung des TH2/TH1-Gleichgewichts gesehen werden.

Die Erniedrigung der *TGFβ2*-Expression bei Allergikern in-season könnte das Korrelat einer verminderten Kontrolle des T-Zell-vermittelten Entzündungsgeschehens durch Treg-Zellen bei Allergikern darstellen. So konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass TGFβ2 die FoxP3-Expression in T-Vorläuferzellen triggert und zur Bildung von Tregs beiträgt (Fu et al., 2004). Andererseits ist TGFβ ein wichtiges von Tregs produziertes Zytokin. Das Verhältnis vorhandener Treg-Zellen zu TH2-Zellen ist bei Allergikern anders als bei Nicht-Allergikern und könnte eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Allergien spielen (M. Akdis et al., 2004). So spricht einiges dafür, dass bei Allergikern die Anzahl oder Funktion der Tregs mangelhaft ausgeprägt ist und dieser Zustand mitverantwortlich in der Genese der allergischen Erkrankung ist (Robinson, 2009).

Interessant ist zudem die erniedrigte Expression des Fas-Liganden (*FASLG*) in der Pollensaison bei den Allergikern. Das Fas/Fas-Ligand-System ist essentiell für die Apoptose und Homöostase der T-Zellen, sodass spekuliert werden kann, dass möglicherweise bei Allergikern die T-Zell-Regulation über diesen Weg gestört ist, die T-Zellen gleichsam ungebremst, „überaktiv“ sind.

Einige der beschriebenen Veränderungen lassen sich interessanterweise lediglich in bzw. außerhalb der Pollensaison nachweisen. Zu bedenken ist hierbei immer, dass die Genexpression durch eine Vielzahl von Variablen beeinflusst wird und die hier untersuchten Materialien lediglich eine Momentaufnahme widerspiegeln. Zudem kommt es durch die Grenzen für statistische Signifikanz zu Einschränkungen, sodass möglicherweise Tendenzen, die sich tatsächlich sowohl in als auch außerhalb der Pollensaison zeigen, zu einem der beiden Zeitpunkte knapp das Signifikanzniveau überschreiten und deshalb in der entsprechenden „heatmap“ nicht dargestellt werden. Aufgrund dessen sollten diese Differenzen nicht überinterpretiert werden – zugleich ist es aber interessant, welche der Marker unabhängig vom Zeitpunkt entsprechend exprimiert werden und sich damit als möglicherweise stabilere oder verlässlichere Marker präsentieren (vgl. etwa Abschnitt 3.3.3 im Ergebnisteil).

Abgesehen davon ist es durchaus denkbar, dass etwa das TH1/TH2-Gleichgewicht jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, die bisher nicht im Detail erforscht worden sind. In einer finnischen Studie wurde bereits 1993 bei gesunden Probanden im Winter eine höhere IFN-γ-Produktion als im Sommer beobachtet (Katila et al., 1993). Bakhru et al. berichten von

einer schwächeren TH1-Antwort in PBMCs bei gesunden Kontrollen in der Pollensaison gegenüber außerhalb der Pollensaison (Bakhru, 2014).

Würde es sich im Sputum und auf Transkriptomebene ebenso verhalten, könnte das etwa bedeuten, dass eine TH1-Abschwächung bei Allergikern gegenüber Kontrollen außerhalb der Saison dann weniger deutlich wird als in der Saison, da die Bezugsgröße (Ausprägung der TH1-Antwort bei gesunden Kontrollen) und damit die Differenz zur Vergleichsgruppe je nach Saison unterschiedlich ist. Rein hypothetisch könnte dies etwa eine Erklärung dafür sein, dass *IFN γ* in der vorliegenden Analyse bei Allergikern gegenüber Kontrollen in der Pollensaison signifikant erniedrigt ist, außerhalb der Saison jedoch nicht. Geht man von der Annahme aus, dass bei saisonaler Allergie in der Pollensaison die TH2-Dominanz stärker ausgeprägt ist als außerhalb der Saison, wäre das darüber hinaus eine plausible Erklärung dafür, dass damit wiederum *IFN γ* als Repräsentant der TH1-Antwort nur in der Saison bei Allergikern signifikant niedriger ist als bei Kontrollprobanden, da außerhalb der Saison das TH1/TH2-Gleichgewicht weniger Richtung TH2 verschoben ist.

Zusammengefasst sind auf Transkriptomebene neben Korrelaten der verstärkten Entzündungsaktivität bei Allergikern (z. B. *IL8*, *S100A8*, *CCL24* hochreguliert) und des Atemwegs-Remodelings (*TNFSF14*, *TSLP* hochreguliert) auch mögliche Zeichen einer verminderten T-Zell-Kontrolle (*TGF β 2*, *FASLG* herunterreguliert) und einer TH2-Prädominanz (*CSF1*, *IL4*, *IL13RA2*, *IL24*, *CLCA1* und *SerpinB2* hochreguliert; *IFN γ* , *IL15RA* herunterreguliert) nachvollziehbar.

4.2.1.2 Veränderungen bei allergischer Rhinitis (ohne Asthma) vs. gesunde Kontrollen

Um herauszufinden, welche Gene im Sputum bei Teilnehmern mit allergischer Rhinitis, jedoch ohne Asthma bronchiale, verändert exprimiert werden, analysierten wir die Unterschiede bei allergischen Rhinitikern ohne Asthma und ohne SCIT vs. gesunde Kontrollprobanden (vgl. Abbildung 19). Hier zeigte sich, dass oben bereits beschriebene Marker wie *TSLP*, *CCL24* und *IL8* bei Probanden mit allergischer Rhinitis gegenüber Kontrollprobanden erhöht waren, ebenso *S100A8*, *CSF1* und *CLCA1*.

Das ebenfalls bei allergischen Rhinitikern erhöhte *IL7* ist nicht nur wichtig für die Entwicklung von B- und T-Lymphozyten, sondern auch für die Entwicklung und Funktion der ILC (innate lymphoid cells), unter anderem ILC2, die eine Rolle bei der Initiation der Typ-2-Immunität spielen und TH2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren, aber auch zu

chronischen Prozessen wie Fibrose beitragen können und in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale eine wichtige Rolle einzunehmen scheinen (McKenzie, 2014; Yu et al., 2014).

ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das für die Adhäsion inflammatorischer Zellen an Gefäßendothel, extrazelluläre Matrix und Epithel wichtig ist. Darüber hinaus vermittelt es aber auch T-Zell-Kontakte und Interaktionen zwischen B- und T-Zellen. Erhöhte ICAM-1-Expression auf der Oberfläche von T-Zellen im Atemwegslumen konnte bei Asthma nachgewiesen werden (Stanciu & Djukanovic, 1998). Die ICAM-1-Expression in nasalen Epithelzellen im Rahmen einer allergischen Reaktion wird als wichtiger Marker der allergischen Entzündung gesehen und der Spiegel von löslichem ICAM-1 im nasalen Sekret zeigte sich in der Literatur signifikant höher bei Patienten mit allergischer Rhinitis als bei Gesunden (Gilain et al., 2000). In der vorliegenden Analyse zeigte sich die Expression von *ICAM1* im Sputum bei Probanden mit allergischer Rhinitis innerhalb und außerhalb der Pollensaison höher als bei gesunden Kontrollprobanden (vgl. Abbildung 19).

Interessant ist darüber hinaus die Funktion von ICAM-1 als Haupt-Rezeptor für Rhinoviren (Greve et al., 1989). Rhinovirus-Infektionen sind nicht nur die häufigste Ursache für viral induzierte Asthma-Exacerbationen (Beale et al., 2014), sondern wirken auch in Hinblick auf das Risiko der Entwicklung eines Asthma bronchiale synergistisch mit der allergischen Atemwegsentszündung (Gavala et al., 2011). Viel deutet darauf hin, dass die Koinzidenz nicht nur darauf zurückzuführen ist, dass Personen mit allergischer Rhinitis bzw. Asthma aufgrund ihrer Vorerkrankung prädisponiert für Rhinovirusinfektionen sind, sondern im kausal umgekehrten Sinne Rhinovirusinfektionen einen pathogenetisch relevanten Faktor für die Asthma-Entstehung darstellen: durch die Rhinovirus-Infektion kommt es zur Stimulation von IL-4, IL-13 und Eotaxin-Produktion, zur Einwanderung von Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen, und damit einhergehend zum Anstieg von VEGF, TGF β und anderen Faktoren, die auch beim Remodeling der Atemwege beim Asthma eine Rolle spielen (Stone & Miller, 2015). Die Hochregulation der *ICAM1*-Expression im bronchialen Epithel wird als einer der pathogenetischen Mechanismen für die viral-induzierte Asthma-Exacerbation gesehen (Murray et al., 2004). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass intranasal verabreichte HRV2A-Proteinase (Human rhinovirus proteinase 2A) eine allergische Atemwegsreaktion induzierte (Singh et al., 2010). Vor dem Hintergrund ist es spannend, dass *ICAM1* hier im Sputum bei allergischer Rhinitis jahreszeitenunabhängig verstärkt exprimiert ist. Einerseits könnte spekuliert werden, dass Personen mit allergischer Rhinitis dadurch möglicherweise in erhöhtem Maße anfällig für Rhinovirus-Infektionen sind,

andererseits könnte hierin wiederum ein möglicher Weg der “Bahnung” hin zur Asthma-Entwicklung bei vorbestehender allergischer Rhinitis zum Ausdruck kommen.

VEGF ist ein Protein, das die Gefäßpermeabilität erhöht und die Zellteilung von Endothelzellen induziert. In der Forschung über Allergische Rhinitis wurde 2002 erstmals von Benson et al. über die mögliche Bedeutung von VEGF als Mediator berichtet: Die *VEGFA*-Genexpression in nasalen Biopsien bei Patienten mit symptomatischer saisonaler allergischer Rhinitis gegenüber Kontrollprobanden war hier erhöht (Benson et al., 2002). Bei Asthmatikern konnten erhöhte VEGF-Level in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden. Auch in nasalen Sekreten waren die VEGF-Spiegel bei allergischen Probanden erhöht, insbesondere nach Provokation (Matsune, 2012). Im Mausmodell konnte demonstriert werden, wie VEGF, produziert von Epithel- und TH2-Zellen, durch Stimulation des vaskulären und des Atemwegs-Remodelings, Aktivierung dendritischer Zellen und Stimulation der TH2-Antwort einen Asthma-gleichen Phänotyp mit Atemwegshyperreagibilität, Ödem und Muskelhyperplasie induziert (Lee et al., 2004). VEGF scheint somit ein attraktives Ziel für Prävention bzw. Therapie von Asthma und anderen TH2-dominierten Störungen darzustellen.

Bei unseren Probanden mit allergischer Rhinitis zeigt sich eine verstärkte Genexpression von *VEGFA*, einem Hauptvertreter der VEGF-Familie, gegenüber nicht-allergischen Kontrollprobanden.

MMP-9 gehört zur Familie der von Epithelzellen, Entzündungszellen und Fibroblasten sekretierten Endopeptidasen und ermöglicht durch Degradation extrazellulärer Matrix-Proteine etwa das Übertreten durch Kapillarwand und Interstitium, was zur Rekrutierung und Migration zirkulierender Entzündungszellen wie Eosinophilen zum Ort der Inflammation unerlässlich ist. Sie sind somit Effektoren des Remodelings (Mori et al., 2012). Eine erhöhte MMP-9-Expression ist in nasaler Schleimhaut von Allergikern (Mori et al., 2012) und auch in Sputum und bronchialen Biopsien von Asthmatikern in erhöhter Konzentration nachgewiesen worden (Hoshino et al., 1998; Vignola et al., 1998). MMP-9 gilt als potenzieller im Sputum nachweisbarer Biomarker für das bei chronischem Asthma stattfindende Remodeling des Atemwegsepithels (Cataldo et al., 2002). In unserer Analyse zeigte sich eine erhöhte *MMP9*-Genexpression bei Probanden mit allergischer Rhinitis gegenüber Kontrollprobanden.

Ein weiteres hier bei Probanden mit allergischer Rhinitis erhöht exprimiertes Gen ist *CCR1*. Der hierdurch codierte Chemokinrezeptor, an den v. a. CCL15, aber auch CCL5 (RANTES) bindet, wird u. a. von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, T- und B- Zellen und

auch von der glatten Atemwegsmuskulatur exprimiert. *CCR1* scheint nicht nur durch einen direkten Effekt auf die Leukozyten-Chemotaxis, sondern auch durch Modulation des TH1/TH2-Zytokin-Gleichgewichts die Immunantwort zu beeinflussen (Shimizu & Dobashi, 2012). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei *CCR1*-defizienten Mäusen die Atemwegs-Hyperreaktivität und TH2-Zytokinproduktion deutlich abnahm (Schaller et al., 2008).

Vermindert exprimiert bei Probanden mit allergischer Rhinitis gegenüber Kontrollen war u. a. *SCGB1A1*, auf das im Abschnitt 4.2.3.1 genauer eingegangen wird. Zudem war *CD9* herabreguliert, das in der Literatur mit IL-10-produzierenden B-regulatorischen Zellen in Verbindung gebracht wird (Braza et al., 2015; Sun et al., 2015). Eine verminderte Expression von *CD9* könnte also möglicherweise auf eine verminderte Aktivität der regulatorischen B-Zellen bei Rhinitikern gegenüber Gesunden hindeuten. Hier wären aber letztlich funktionelle oder immunmorphologische Studien nötig. Bekannt ist, dass es bei Breg-Defizit zur Zunahme der allergischen Inflammation kommt (Lundy et al., 2005).

Stellt man das Genexpressionsmuster der Allergiker vs. gesunde Kontrollen unter Einbezug der Asthmatiker dem unter Ausschluss der Asthmatiker vergleichend gegenüber, zeigt sich, dass viele der beobachteten Auffälligkeiten nicht ans Asthma gekoppelt zu sein scheinen. So kommt es auch bei Nicht-Asthmatikern zu einer verstärkten Expression zahlreicher Gene, die für in die allergische Entzündung einbezogene Proteine codieren, etwa *IL8*, *SI00A8*, *CCL24*, *SCGB1A1* und *CSF1*. Interessanterweise sind aber auch einige Gene gleichsinnig verändert, die vorwiegend mit dem Remodeling der Atemwege beim Asthma in Verbindung gebracht werden, etwa *TSLP* und *MMP9*. Dahingegen erscheint die Ausprägung solcher Gene, die als Korrelat der TH2-Prädominanz gesehen werden können, bei der Untergruppe der Rhinitiker nicht mehr so deutlich verändert wie bei der Gesamtheit der Allergiker, sodass die Vermutung naheliegt, dass die TH1/TH2-Dysbalance im Kollektiv der Asthmatiker im Sputum möglicherweise stärker auf Transkriptomebene nachvollziehbar ist als im Kollektiv der nicht-asthmatischen Rhinitiker.

Die beschriebenen Veränderungen auf Transkriptomebene deuten zusammengefasst darauf hin, dass bei Patienten mit allergischer Rhinitis bereits auch die unteren Atemwege in einer Weise verändert sind, die in Richtung allergisches Asthma deutet, selbst wenn die Patienten subjektiv und klinisch noch keinerlei Hinweis auf ein solches haben. Dies illustriert die Vorstellung, dass allergische Rhinitis nicht nur ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Asthma bronchiale darstellt, sondern darüber hinaus gleichsam eine latente, subklinische

Inflammation auch der unteren Atemwege mit sich bringt. Sollte sich in zukünftigen Untersuchungen eine Korrelation der oben beschriebenen Transkriptomuster zum weiteren Krankheitsverlauf herausstellen, könnte sich eine prognostische Bedeutung ergeben (etwa die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale bei bestimmter Expression der jeweiligen Marker). Darüber hinaus könnte potentiell durch einen Nachweis der Reversibilität der jeweiligen Expressionsveränderungen durch die SCIT auf molekularer Ebene ein Korrelat für den Asthma-präventiven Effekt der SCIT bei Probanden mit allergischer Rhinitis (Jacobsen et al., 2012) nachvollzogen werden.

4.2.2 Allergiker mit vs. ohne Asthma

Um Unterschiede im Genprofil der Allergiker mit Asthma gegenüber solchen Allergikern, die an allergischer Rhinitis, aber nicht an Asthma leiden, genauer zu untersuchen, erfolgte der Vergleich dieser beiden Subgruppen, jeweils bei Probanden ohne SCIT.

Bereits im Vergleich Allergiker vs. gesunde Kontrollen war eine verstärkte Expression des *CSFI*-Gens festzustellen, das für ein für die Produktion, Differenzierung und Funktion von Makrophagen wichtiges Protein codiert. Diese verstärkte Expression ist auch bei Allergikern mit gegenüber solchen ohne Asthma nachweisbar (vgl. Abbildung 20).

Auch *CCL1*, das chemotaktisch auf TH2-Zellen wirkt, war bei Probanden mit Asthma verstärkt exprimiert (vgl. hierzu geringere Expression von *CCL1* bei Asthmatikern mit SCIT, Abschnitt 4.2.3.2).

Interessant ist auch die erhöhte Exprimierung von *CXCL12* (= *SDF1A*) bei Asthmatikern. Dieses Chemokin hat multiple Funktionen, etwa in der Embryogenese, im Tumorwachstum, aber auch in der inflammatorischen Antwort, indem es chemotaktisch auf Monozyten und Lymphozyten wirkt. Die Neutralisierung von CXCL-12 oder seinem Rezeptor CXCR-4 führte im experimentellen Setting bei Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der allergischen Entzündung, der Eosinophilie in bronchoalveolärer Lavage und der bronchialen Hyperreaktivität (Gonzalo et al., 2000). Dass die Expression bei Asthmatikern höher ist als bei nicht-asthmatischen Rhinitikern, kann für eine allgemein stärkere lokale Entzündung bei dieser Subgruppe sprechen, oder daran liegen, dass CXCL-12 im Speziellen bei allergischem Asthma eine größere Rolle spielt als bei allergischer Rhinitis.

IL24, das bei unseren allergischen Probanden höher exprimiert war als bei gesunden Kontrollprobanden (vgl. Abschnitt 4.2.1), scheint dabei innerhalb der Gruppe der Allergiker

im bronchialen Sputum bei den Asthmatikern stärker als bei den nicht-asthmatischen Rhinitikern exprimiert zu werden. Als unter anderem von TH2-Zellen produziertes Zytokin ist dies mit der Vorstellung, dass bei Asthmatikern lokal in den Atemwegen eine stärkere TH2-Immunreaktion vorliegt als bei nicht-asthmatischen Rhinitikern, gut vereinbar.

Dazu stimmig kann auch die bei Asthmatikern geringere Expression der Gene für die Mediatoren IL-15RA, CCL20, CXCL-9,-10 und -11 interpretiert werden, die IFN- γ -induziert und damit im weiteren Sinne als Vertreter der TH1-Antwort gesehen werden können – was für eine relativ stärkere TH2-Prädominanz gegenüber TH1 bei den Asthmatikern als bei den Rhinitikern ohne Asthma am Ort der Sputumgewinnung, also dem unteren Atemwegstrakt, spricht. Ähnlich kann auch gedeutet werden, dass in unserer Analyse *IL12A* bei Asthmatikern weniger stark exprimiert ist als bei nicht-asthmatischen Rhinitikern. IL-12A ist eine Untereinheit des Zytokins IL-12, welches wiederum über Aktivierung von STAT4 unverzichtbar für die Differenzierung von naiven T- zu TH1-Zellen ist (Athie-Morales et al., 2004).

Auch *CD86*, das im Mausmodell auf dendritischen Zellen die Differenzierung Richtung TH2-Zellen fördert und in der Interaktion zwischen TH2- und B-Zellen als Co-Stimulator essentiell ist (J. G. Li et al., 2016; Nakajima et al., 1997), ist in unserer Studie bei Asthmatikern hochreguliert.

IL32 scheint bei Asthmatikern im bronchialen Sputum weniger stark exprimiert zu sein als bei Probanden mit vorwiegend allergischer Rhinitis. Dieses Zytokin spielt eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Entzündungsmediatoren bei allergischer Rhinitis (Jeong et al., 2011). In bronchialen Epithelzellen wird es durch TH1-Zellen und IFN- γ induziert und scheint Angiogenese zu inhibieren.

Dass *Fasligand* und *TGF β 2* innerhalb der Gruppe der Allergiker vor allem bei den Asthmatikern herabreguliert ist, könnte darauf deuten, dass die oben beschriebene These der verminderten T-Zell-Kontrolle in der allergischen Inflammation, zumal am Ort der Sputumentstehung, vor allem bei Asthma zutrifft.

CCL5 (= RANTES) wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Memory-T-Helferzellen und Eosinophile und bewirkt die Histaminfreisetzung aus Basophilen. Über eine verstärkte CCL5-Sekretion in den unteren Atemwegen, gemessen im induzierten Sputum bei Personen mit allergischer Rhinitis ohne Asthma nach nasaler Allergenexposition, ist berichtet worden (Semik-Orzech et al., 2009). Somit stellt RANTES möglicherweise einen Marker dar, der

speziell in dieser Subgruppe, zumal in der Pollensaison bei entsprechender Grundexposition, nachweisbar sein kann.

Dazu würde die verstärkte Expression bei nicht-asthmatischen Rhinitikern im Vergleich zu Asthmatikern in unserer Untersuchung passen; und auch die Beobachtung, dass der Rezeptor, *CCRI*, bei nicht-asthmatischen Rhinitikern gegenüber Kontrollen verstärkt exprimiert ist, während sich dieser Effekt in der Gesamtgruppe der Allergiker nicht nachweisen lässt (siehe oben, Abschnitt 4.2.1.2), deutet in diese Richtung.

Von *IL22RA1* wird im folgenden Kapitel noch die Rede sein, denn dieser – hier bei Asthmatikern verstärkt exprimierte – sekretierte Mediator wird offenbar durch die SCIT herabreguliert (vgl. Abschnitt 4.2.3.2).

Das Expressionsmuster in dieser Gegenüberstellung passt zu der schon im Vergleich „alle Allergiker vs. Kontrollen“ vs. „Rhinitiker vs. Kontrollen“ aufgefallenen Beobachtung, dass Korrelate der TH2-Prädominanz bei Asthmatikern deutlicher ausgeprägt sind. So zeigt die Gegenüberstellung Asthmatischer vs. Rhinitiker, dass *IFN γ* und die von diesem induzierten *CXCL 9-11*, *CCL20*, *IL32* und *IL15RA* bei Asthmatikern vermindert exprimiert sind, das TH2-induzierte *IL24* etwa aber verstärkt. Auch die Korrelate für verminderte Treg-Ausprägung, die im Vergleich Allergiker vs. Kontrollen nachvollziehbar waren, im Vergleich Rhinitiker vs. Kontrollen jedoch nicht, sind nun wieder feststellbar (*TGF β 2* vermindert exprimiert), was beides dafürspricht, dass die Treg-Ausprägung bei Asthmatikern im Sputum mehr kompromittiert ist als bei Rhinitikern.

Insgesamt sind die signifikanten Unterschiede im Transkriptom bezüglich sekretierten Mediatoren jedoch überschaubar, was für die Annahme spricht, dass bei der Allergischen Rhinitis auch ohne Asthma bereits die Genregulation in den im bronchialen Sputum enthaltenen Zellen in vielen Fällen relativ ähnlich zu der des Asthmatischer ist, der Weg zum sich möglicherweise im Verlauf entwickelnden Asthma gleichsam bereits geebnet ist.

Die vielfach ähnliche Genexpression bei allergischen Probanden mit und ohne Asthma unterstreicht die Zusammengehörigkeit dieser beiden Ausprägungsformen und deutet darauf hin, dass es Sinn macht, die Krankheitsbilder der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas im Zusammenhang zu betrachten. Die große Überschneidungsfläche bietet umgekehrt auch großes Potential, etwa im diagnostischen Bereich, wenn beispielsweise aus Material der oberen Atemwege auch Aussagen über die unteren Atemwege getroffen werden können.

4.2.3 Allergiker mit vs. ohne SCIT

4.2.3.1 Allergiker (mit und ohne Asthma) mit vs. ohne SCIT

Wir untersuchten zunächst die Effekte der SCIT in der Gesamtgruppe der Allergiker, unabhängig vom Asthmastatus (vgl. Abbildung 21).

Für eine Reihe von für Zyto- und Chemokine codierenden Genen, die in der vorliegenden Transkriptomanalyse bei Allergikern gegenüber Kontrollprobanden verstärkt exprimiert sind (vgl. Abschnitt 4.2.1.1), zeigt sich eine signifikante Herabregulierung bei Probanden mit SCIT, was darauf hindeutet, dass die Expression der entsprechenden Mediatoren durch die SCIT deutlich reduziert bzw. die übermäßige Expression abgemildert bzw. normalisiert wird. Dies betrifft einerseits allgemeine Mediatoren der allergischen Entzündung, etwa das Neutrophilen-chemotaktische *IL8* und das proinflammatorisch wirkende *S100A8*. Dies lässt sich als Korrelat der durch die SCIT abnehmenden entzündlichen Aktivität in den Atemwegen deuten. Auch in der Messung auf Proteinebene mittels Mesoscale war IL-8 bei Probanden mit allergischer Rhinitis mit SCIT signifikant erniedrigt gegenüber solchen ohne SCIT (siehe Abbildung 32 in Abschnitt 3.5)

Daneben waren aber auch solche Mediatoren bei Probanden mit SCIT herabreguliert, die als Korrelat der TH1/TH2-Dysbalance interpretiert werden können. So waren die bei Allergikern gegenüber Gesunden verstärkt exprimierten Gene *IL13RA2*, *IL24*, *CSF1* und *CLCA1* allesamt bei Allergikern mit SCIT signifikant herabreguliert. Da sie alle im weiteren Sinne mit dem Überwiegen einer TH2-Antwort assoziiert werden können, spricht die Herabregulierung durch die SCIT für eine Abschwächung der TH2-Prädominanz durch die Therapie.

Dass – relativ gesehen – die TH1-Zytokine dadurch verstärkt exprimiert werden, zeigt sich beispielsweise in der verstärkten Expression des klassischen TH1-Vertreters *IFN γ* in der Pollensaison bei Probanden mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT. Ein Anstieg von IFN- γ nach spezifischer Immuntherapie gegen Bienengift ist in der Literatur beschrieben (Jutel et al., 1995). Eine ebenfalls verstärkte Expression durch die SCIT zeigt *IL15RA*, der wie beschrieben mit der TH1-Antwort assoziiert wird.

Auch *SCGB1A1* (Sekretoglobin-Familie, auch genannt Uteroglobin, CC16) war bei Probanden mit SCIT hochreguliert. Die genaue Funktion des zugehörigen Proteins ist nicht bekannt, es scheint jedoch unter anderem Phospholipase A2 zu inhibieren und zahlreiche immunmodulatorische und antiinflammatorische Funktionen inne zu haben, insbesondere auch bei der Unterdrückung Allergen-induzierter Entzündungsreaktionen (Mandal et al.,

2004). Defekte in diesem Gen werden wiederum mit einem hohen Asthma-Risiko in Verbindung gebracht (Nie et al., 2013).

Erniedrigte SCGB1A1-Spiegel bei Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern sind im Urin, im Serum und in bronchoalveolärer Lavage festgestellt worden (Guerra et al., 2016; Ma et al., 2015; Shijubo et al., 1999). In unserer Studie zeigte sich eine verminderte Genexpression von *SCGB1A1* bei Allergikern gegenüber Gesunden (vgl. Abbildung 18). So könnte spekuliert werden, dass durch die SCIT eine Anhebung im Sinne einer Normalisierung des *SCGB1A1*-Expressions-Levels induziert wird.

Das Zytokin IL-7 hat eine wichtige Rolle als Regulator von Überleben bzw. Homöostase von T-Lymphozyten, sowohl naive als auch memory-B-Zellen sind zudem von IL-7 abhängig (Bradley et al., 2005). Eine erhöhte Expression des *IL7*-Gens bei Probanden mit SCIT könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass es als wichtiger Wachstumsfaktor für B- und T-Lymphozyten im Rahmen einer verstärkten Treg-Bildung/-Aktivierung verstärkt benötigt werden könnte. Im Mausmodell konnte die Bedeutung von IL-7 für Treg-Zellen gezeigt werden (Di Caro et al., 2011; Schmalzer et al., 2015; Simonetta et al., 2012).

Daneben fiel bei Allergikern mit SCIT eine Herabregulierung des Periostin-Gens (*POSTN*) auf. Dieses extrazelluläre Matrix-Protein ist in viele Prozesse der allergischen Entzündungsreaktion involviert, wie die vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren, die Rekrutierung von Eosinophilen und das Atemwegs-Remodeling. Periostin wird in Atemwegs-Epithelzellen und Fibroblasten durch IL-4 und IL-13 induziert und stellt einen wichtigen Biomarker für die TH2-geführte Atemwegsentszündung dar. Es scheint mit der Eosinophilenzahl zu korrelieren und somit insbesondere beim eosinophilen Asthma eine wichtige Rolle zu spielen (W. Li et al., 2015). Nach Durchführung der Immuntherapie ist die Ausübung dieser Funktionen durch verminderte Expression abgeschwächt.

In einer Phase II-Studie zeigte sich Periostin darüber hinaus als Surrogatmarker für die IL-13-Aktivität und erwies sich somit als nützlich für die Evaluation des Ansprechens auf Anti-IL-13-Therapie (Corren et al., 2011), jedoch konnte dies nicht in Phase III-Studien bestätigt werden (Hanania et al., 2016).

Darüber hinaus zeigt sich bei Allergikern mit SCIT eine Herabregulierung der bei Allergikern gegenüber gesunden Kontrollen erhöhten Mediatoren *TNFSF14* und *TSLP*, die neben der Rolle im Rahmen der TH2-Antwort vor allem das Atemwegs-Remodeling beeinflussen.

Zudem untersuchten wir, welche Gene für sekretierte Faktoren bei Allergikern durch die SCIT unabhängig vom Zeitpunkt der Erhebung hochreguliert waren, also sowohl in als auch außerhalb der Pollensaison verstärkt exprimiert, vor dem Hintergedanken, dass hierin tendenziell eher langfristig wirkende Mechanismen zum Ausdruck kommen und ein potenzieller Biomarker optimalerweise ganzjährig stabil aussagekräftig sein sollte (vgl. Abbildung 21c). So können transkriptionelle Korrelate für wichtige Effekte der SCIT, nämlich abnehmende Entzündung (*SCGB1A1* hochreguliert), relativ steigende TH1-Antwort (*IL15RA* hochreguliert), abnehmende TH2-Antwort (*IL24* herabreguliert) und möglicherweise sogar indirekte Hinweise auf verstärkte Treg-Aktivierung (*IL7* hochreguliert) stabil in und außerhalb der Pollensaison im Sputum von Probanden sowohl mit als auch ohne allergisches Asthma nachgewiesen werden.

Kurz erwähnt sein soll an dieser Stelle noch die Expression des Gens für den Androgenrezeptor (*AR*). Dieser zeigt sich bei Allergikern mit SCIT in der Saison hochreguliert gegenüber solchen ohne SCIT und bei Rhinitis in der Saison stärker exprimiert als bei Asthma. Auch wenn auf den ersten Blick keine Verbindung zur allergischen Entzündung ersichtlich ist, wurde in der Literatur schon mehrfach über mögliche Zusammenhänge berichtet: So scheint ein niedriges Testosteronlevel Immunvorgänge auf eine Weise zu beeinflussen, die das Asthmarisiko erhöht, sodass möglicherweise sogar ein gewisses Potential als therapeutischer Ansatz im Sinne eines selektiven Androgen-Rezeptor-Modulators oder einer Testosteron-Ersatztherapie postuliert wird (Canguven & Albayrak, 2011), Zudem scheint der Androgen-Rezeptor eine Rolle bei der ILC2-Differenzierung und der ILC2-abhängigen Typ2-Antwort auf IL-33 zu spielen (Laffont et al., 2017).

Zu beachten ist hier allerdings die Geschlechterverteilung innerhalb der Subgruppen, so war in unserem Fall etwa unter den Allergikern mit SCIT der Frauenanteil deutlich höher (m:w = 2:6) als bei den Allergikern ohne SCIT (m:w = 4:3), was die Vergleichbarkeit einschränkt.

Eine weitergehende Interpretation der diesbezüglichen Ergebnisse ist mit bisherigem Kenntnisstand zu gewagt, jedoch ist allein die Tatsache interessant, dass das Androgenrezeptor-Gen in mehreren Subgruppen dieser Analyse als verstärkt oder vermindert exprimiert auftrat; möglicherweise ein weiterer Hinweis auf einen bestehenden Zusammenhang, der aber mit Sicherheit noch weitergehende Analysen erfordert.

4.2.3.2 Allergische Asthmatiker mit vs. ohne SCIT

Gibt es Auffälligkeiten, möglicherweise spezifische Marker, oder Unterschiede der Genexpression im Vergleich zur Gesamtkohorte der Allergiker, wenn die Effekte der SCIT speziell in der Subgruppe der Allergiker mit Asthma untersucht werden?

Viele der bereits in der Gesamtgruppe der Allergiker mit vs. ohne SCIT beschriebenen Veränderungen der Mediatorenexpression lassen sich auch bei den Asthmatikern mit vs. ohne SCIT reproduzieren: etwa die verstärkte Expression von *SCGB1A1*, *IFN γ* , *IL-15RA* und *IL7* sowie die verminderte Expression von *IL13RA2*, *IL24*, *IL8* und *POSTN*.

Daneben sind jedoch noch einige weitere Mediatoren verändert exprimiert, die in der Gesamtgruppe der Allergiker so nicht auffällig waren:

So ist das Gen *IL16* bei Asthmatikern mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT herabreguliert. Das zugehörige Zytokin kann in der entzündeten Bronchialwand die Rekrutierung von CD4+ Zellen induzieren. Laberge et al. beschrieben eine deutlich erhöhte *IL16*-mRNA-Expression im Bronchialpithel in Bronchialbiopsien von Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern und gesunden Kontrollen (Laberge et al., 1997). Somit könnte es sich hier um einen Asthma-spezifischen Marker handeln, dessen Expression durch die SCIT vermindert, möglicherweise normalisiert wird.

Daneben finden sich eine Reihe Ergebnisse, die die Annahme unterstützen, dass sich durch die SCIT die TH2/TH1-Balance wieder Richtung TH1 bewegt bzw. das Überwiegen der TH2-Antwort gemindert wird.

So ist die Expression typischer TH2-Zytokine wie *IL5*, *IL5RA* und *IL13* in der Gruppe der Asthmatiker mit SCIT herabreguliert (vgl. Abbildung 22a). Dass allergische Asthmatiker erhöhte *IL5* und *IL13*-mRNA-Spiegel im Sputum aufweisen, ist bekannt (Peters et al., 2014; Truyen et al., 2006); auch bei unseren allergischen Probanden war die *IL13RA2*-Expression erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (vgl. Abschnitt 4.2.1.1, Abbildung 18). Diese Überexpression scheint also durch die SCIT wieder abgeschwächt zu werden. Ähnliche Beobachtungen auf Ebene der tatsächlichen Zytokin-Sekretion zeigte Jutel et al. bezüglich Bienengift-Immuntherapie, bei der der IL-4- und IL-5-Spiegel nach Immuntherapie abfielen (Jutel et al., 1995). Auch in unserer Mesoscale-Messung zeigte sich IL-5 durch die SCIT vermindert, hier war allerdings der Effekt vor allem bei Probanden mit allergischer Rhinitis ohne Asthma deutlicher nachvollziehbar (vgl. Abschnitt 3.5, Abbildung 31), sodass eine Spezifität für Asthma fraglich erscheint.

Zu einer Abschwächung der TH2-Antwort passt auch die verminderte Expression von *CCL1*, einem TH2-rekrutierenden Chemokin, und von *IL19* bei Asthmatikern mit SCIT. Von IL-19, das wie IL-24 zur IL-10-Familie gehört, ist über eine TH2-Zytokin-induzierende Wirkung berichtet worden (Liao et al., 2004).

Auch das ebenfalls bei Asthmatikern mit SCIT herabregulierte, durch IL-4 bzw. IL-13 induzierte *CCL26* (Eotaxin-3) kann zu den Vertretern der TH2-Antwort gerechnet werden. Darüber hinaus konnte eine Verbindung der *CCL26*-Produktion durch IL-13 stimulierte bronchiale Epithelzellen mit der Sputum-Eosinophilenzahl und dem Asthma-Schweregrad gezeigt werden, sodass es ein potentielles Angriffsziel für die Therapie insbesondere refraktärer Patienten mit schwerem eosinophilen Asthma darstellen könnte (Larose et al., 2015). Über die Stimulation der Fibroblasten-Migration scheint *CCL26* zum Atemwegs-Remodeling beizutragen (Kohan et al., 2010). Somit stellt Eotaxin-3 ein weiteres mögliches Korrelat der Verminderung des Remodelings beim allergischen Asthma durch die Hyposensibilisierung dar.

In der Analyse der Expression auf Proteinebene lässt sich die verminderte *CCL26*-Expression bei Probanden mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT auch in der Gruppe der Probanden mit allergischer Rhinitis nachvollziehen, in der Mesoscale-Messung zeigt sich der Effekt knapp an der Signifikanzgrenze ($p = 0,056$) (vgl. Abbildung 30 in Abschnitt 3.5).

Auch das Gen für IL-20, dessen proinflammatorischer Effekt und dessen Rolle beim Remodeling der Atemwege beim Asthma bekannt ist (Gong et al., 2014), war bei Probanden mit SCIT signifikant niedriger exprimiert. Wu et al. zeigten 2014, dass die IL-20-Spiegel im Atemwegseptihel und Serum von Asthmatikern erhöht sind und positiv mit den TH2-Zytokinen IL-4,-5 und -13 und mit dem Schweregrad des Asthmas korrelieren. IL-20 scheint also auch im Rahmen der TH2-Antwort pathophysiologisch eine Rolle zu spielen (Wu et al., 2014).

Als Hinweis auf eine relative Stärkung der TH1-Antwort kann neben der *IFN* γ -Hochregulierung hier auch die vermehrte Expression der durch IFN- γ induzierten Chemokine *CXCL-9*, *-10* und *-11* außerhalb der Pollensaison interpretiert werden (U. M. Zissler et al., 2016).

Zudem war das Gen für Inhibin A, ein Mitglied der TGF β -Familie, bei Asthmatikern mit SCIT weniger stark exprimiert. In erster Linie ist dieses Glykoprotein bekannt für seine Funktion in der Kontrolle der hypophysären FSH-Freisetzung. Jedoch scheint es darüberhinausgehende Funktionen inne zu haben, die auch im Bereich der Immunologie bzw. Allergologie von

Bedeutung sein könnten. So berichteten Hedger et al. bereits 1989 über eine Rolle von Inhibin A im Rahmen der T-Lymphozyten-Regulation in vitro (Hedger et al., 1989). Zudem scheint Inhibin A in der Schwangerschaft die Kapazität der Dendritischen Zellen zur T-Zell-Stimulation herabzusetzen (Segeer et al., 2008). Auch Petraglia et al. untersuchten die Rolle von Inhibin im Rahmen der Zell-vermittelten Immunregulation und beschrieben eine dosisabhängige Induktion der Monozyten-Chemotaxis und eine signifikante Abnahme der IFN- γ -Produktion durch Inhibin (Petraglia et al., 1991). Im Rahmen der TH1/TH2-These könnte also die hier beobachtete Herunterregulation der *Inhibin A*-Expression durch die SCIT für eine verminderte IFN- γ -Hemmung und damit indirekt eine relativ verstärkte TH1-Immunität durch die SCIT sprechen.

Widersprüchlich ist die Datenlage zum hier ebenfalls bei Asthmatikern mit SCIT vermindert exprimierten *IL2*. Dieses ist als T-Zell-Wachstumsfaktor wichtig und gilt gemeinhin als TH1-Repräsentant, wurde jedoch in Exhaled breath condensate bei Asthmatikern gegenüber Kontrollen verstärkt nachgewiesen (Boonpiyathad et al., 2013).

IL-17A und *IL-17F* sind bei der Entstehung einer neutrophilen Entzündung beteiligt und wurden bereits mehrfach im Zusammenhang mit Asthma beschrieben und bei Asthmatikern erhöht nachgewiesen (Larche et al., 2003). Das *IL17F*-Expressionslevel korreliert mit dem Schweregrad des Asthmas (Kawaguchi et al., 2009) und die Hauptproduzenten dieser inflammatorischen Zytokine, TH17-Zellen, könnten vor allem bei schwerem Asthma eine Rolle spielen (Al-Ramli et al., 2008; Alcorn et al., 2010). Die erniedrigte Expression von *IL17A* bzw. *-F* bei allergischen Asthmatikern mit SCIT im Vergleich zu denen ohne SCIT spricht also für eine verminderte Entzündungsaktivität nach erfolgter Immuntherapie, auch in der Saison, also trotz Allergen-Exposition.

IL22RA2 (Interleukin-22-Rezeptor-alpha-2) inhibiert die IL-22-Aktivität und ist in unserer Analyse bei Asthmatikern mit SCIT vermindert. Über das somit möglicherweise aktivere IL-22 ist wurde berichtet, dass es bei Abwesenheit von IL-17A Schleimhaut-protective Effekte vermittelt (Sonnenberg et al., 2010). Auch dies würde – gerade vor dem Hintergrund der eben beschriebenen verminderten *IL17A*-Expression nach SCIT – in der Annahme einer herabgesetzten Entzündungsaktivität in der Bronchialschleimhaut von mit SCIT behandelten Asthmatikern aufgehen bzw. spricht für eine Entwicklung hin zur Schleimhautprotektion durch die Immuntherapie.

Zudem zeigt sich das Gen für ADAMTS-4 bei Asthmatikern mit SCIT erniedrigt, die als Mitglied der Metalloproteinasen wichtig bei Zellmigration und Kontrolle der Homöostase der

Extrazellulären Matrix ist. Für andere Mitglieder derselben Familie ist ein Zusammenhang zum Asthma bereits mehrfach beschrieben worden, etwa für ADAM-8, die mit Atemwegsentzündung beim Asthma und ADAM-33, die mit Remodeling und bronchialer Hyperreaktivität in Verbindung gebracht wird (Paulissen et al., 2009). Zudem ist gezeigt worden, dass im Mausmodell *ADAMTS4* bei 5-wöchiger Allergenexposition auf transkriptionaler Ebene hochreguliert wurde (Di Valentin et al., 2009). Ein konkreter Bezug dieses Gens zum Asthma oder gar zum Effekt der SCIT beim Menschen ist somit noch nicht im Detail erforscht, erscheint aber durchaus denkbar.

Auch in dieser Gegenüberstellung fallen wieder Unterschiede im Genexpressionsprofil *in* gegenüber *außerhalb* der Saison auf. Einige Gene sind jedoch auch unabhängig vom Zeitpunkt der Erhebung gleichsinnig reguliert. Bei der Subgruppe der allergischen Asthmatiker mit vs. ohne SCIT zeigen sich hier neben dem bereits beschriebenen *IL24* das stabil herabregulierte *IL17A* als möglicher Repräsentant des Asthma-Schweregrads und *IL22RA2* als mögliches Korrelat des schleimhautprotektiven Effekts der SCIT.

Zusammengefasst untermauern die hier erhobenen Daten auf Transkriptomeebene die These, dass durch die SCIT einerseits eine Verminderung der allergischen Entzündungsaktivität allgemein vermittelt wird (Herabregulierung einer Reihe proinflammatorischer Mediatoren mit bekannter Rolle beim allergischen Asthma/Rhinitis bei Probanden mit SCIT sowohl off- als auch in-season), andererseits das Überwiegen der TH2-Antwort zugunsten einer stärkeren TH1-Antwort abgemildert wird. Dafür spricht die verminderte Expression TH2-assoziiierter sekretierter Faktoren bei relativ stärkerer Expression TH1-assoziiierter Gene bei Allergikern bzw. Asthmatikern mit gegenüber solchen ohne SCIT sowohl off- als auch in-season. Darüber hinaus können spekulativ mögliche transkriptionelle Hinweise für die protektive Wirkung der SCIT durch Verminderung des Remodeling und Aktivierung von Treg-Zellen nachvollzogen werden. Speziell in der Gruppe der Asthmatiker zeigt sich tendenziell noch prominenter als in der Gesamtgruppe der Allergiker die Regulation der TH2-Prädominanz, einiger Mediatoren des Remodelings (*IL20*, *CCL26*, *ADAMTS4*-Expression bei Asthmatikern mit SCIT vermindert) und zusätzlich Hinweise auf einen möglichen schleimhautprotektiven Effekt der Immuntherapie (*IL22RA2*-Expression bei Asthmatikern mit SCIT vermindert).

Es wird ersichtlich, dass aus induziertem Sputum der Nachweis einer Vielzahl potenzieller Biomarker möglich ist. Deutlich wird aber auch, dass es aufgrund der Komplexität der pathophysiologischen Zusammenhänge eine große Herausforderung ist, aus der immensen

Anzahl veränderter Parameter einen – oder einige wenige – Biomarker zu identifizieren, die für die Anwendung im klinischen Alltag geeignet sind.

Um herauszufinden, ob die beobachteten Veränderungen der Genexpression reproduzierbar und valide sind, werden entsprechende weiterführende Studien erforderlich sein.

4.2.4 Expression der Transkriptionsfaktoren

In der Gegenüberstellung Allergiker vs. gesunde Kontrollen zeigt sich auf Ebene der Transkriptionsfaktoren unter anderem die verminderte Expression von *TCF7* bei den Allergikern. Dieses Gen wird vornehmlich in T-Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von ILCs und NKs. Das zugehörige Protein bildet einen Komplex mit β -Catenin und aktiviert die Transkription über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Bei *TCF7*-knockout-Mäusen kommt es zu einer gestörten T-Zell-Differenzierung. Vor allem die Interaktion von *TCF7* mit *IL-17* ist jedoch interessant: Der Transkriptionsfaktor *TCF7* kann die Expression des *IL17*-Gens reprimieren (Zhu et al., 2015). Wie bereits beschrieben, wirken insbesondere *IL-17A* und *IL-17F* proinflammatorisch und korrelieren mit dem Schweregrad des Asthmas.

Spannend ist hier auch der Einfluss der SCIT: so ist *TCF7* bei Asthmatikern mit Immuntherapie hoch- und *IL17A* bzw. *IL17F* herunterreguliert (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 22b). Über verstärkte Expression von *TCF7* könnte es also durch die SCIT zu einer verstärkten Hemmung der proinflammatorischen Wirkung von *IL-17* kommen, was einen weiteren Mechanismus der Abnahme der Entzündungsaktivität durch die Therapie darstellen könnte.

Jedoch sind die Kenntnisse bezüglich der Rolle von *TCF7* zum Teil widersprüchlich. So wurde auch über eine *IL-4* induzierende, also TH2-fördernde Wirkung und ILC-stimulierende Effekte berichtet (Zhu et al., 2015) sowie über eine möglicherweise Treg-hemmende Funktion im Thymus im Mausmodell (Barra et al., 2015).

Vergleicht man die Expression der für Transkriptionsfaktoren codierenden Gene bei Probanden mit allergischer Rhinitis (ohne Asthma, ohne SCIT) gegenüber den gesunden Kontrollprobanden, zeigt sich u. a. eine verstärkte Expression von *TFE3* bei den Teilnehmern mit allergischer Rhinitis. *TFE3* ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl bei der Funktion von B- und T-Zellen eine Rolle spielt, als auch bei Mastzellen. So zeigen in vivo-Experimente, dass der Plasma-Histamin-Spiegel bei *TFE3*-defizienten Mäusen nach Triggerung mit

Allergenen deutlich erniedrigt ist (Yagil et al., 2012) und die B-Zell-Aktivierung behindert ist (Merrell et al., 1997). Umgekehrt könnte also die verstärkte Expression bei Rhinitikern auf die erhöhte B-Zell-, T-Zell- und Mastzellaktivität hindeuten.

Zudem ist das Gen für PPAR γ bei den Rhinitikern außerhalb der Saison vermindert exprimiert. Dabei handelt es sich um ein Protein, das diverse Rollen bei Zelldifferenzierung, -entwicklung und -stoffwechsel spielt. Studien mit PPAR-knockout-Mäusen zeigten, dass die PPAR-Familie eine wichtige Rolle bei T-zell-gebundenen Autoimmunerkrankungen spielt. So regulieren PPARs T-Zell-Überleben, -aktivierung und die T-Zell-Differenzierung zu TH1-, TH2-, TH17- und Treg-Zellen. Im experimentellen Setting führt PPAR γ -Mangel zu einer verminderten Zahl an Tregs (Choi & Bothwell, 2012). Somit könnte die verminderte Genexpression von PPAR γ auf einer verminderten Aktivität der Tregs bei Allergikern hindeuten. Interessanterweise ist die PPAR γ -Genexpression bei Allergikern mit SCIT gegenüber denen ohne SCIT erhöht, was sehr gut zu einer Zunahme an Tregs als zentralen Wirkmechanismus der Immuntherapie passt.

Im Vergleich Allergiker mit vs. ohne Asthma zeigt sich unter anderem eine erhöhte Expression von *FOXI1* bei den Asthmatikern. FOXI1 scheint im Mausmodell für die Expression von Pendrin, einem epithelialen Anionentransporter, essentiell zu sein, welcher wiederum mit Atemwegs-Hyperreagibilität und -entzündung in Verbindung gebracht wird. So wiesen Pendrin-knockout-Mäuse im Vergleich zu Kontrollen eine deutlich reduzierte Allergen-induzierte Atemwegshyperaktivität auf (Rozenfeld et al., 2011). Dazu passt auch die Beobachtung, dass die *FOXI1*-Expression hier nur in der Kohorte der Asthmatiker, nicht jedoch in der Gesamtgruppe der Allergiker, durch die SCIT herabreguliert wird. Somit liegt die Vermutung nahe, dass dieser Marker vornehmlich für die Gruppe der Asthmatiker relevant ist. Seshadri et al. berichten bei Patienten mit chronischer Rhinosinusitis, dass die Pendrinexpression durch TH2-Zytokine induziert wird und signifikant mit den Entzündungszellmarkern und IL-13 korrelierte sowie die Mukus-Produktion in nasalen Polypen modulieren könnte. Zudem konnte eine Suppression der Pendrin-Expression durch Dexamethason gezeigt werden, sodass die Regulation der Pendrin-Expression eine Rolle im Wirkungsmechanismus von Glucocorticoiden bei der Therapie des Asthma bronchiale spielen könnte (Seshadri et al., 2015).

TBX21 ist bei Asthmatikern in der Pollensaison herabreguliert gegenüber Rhinitikern. Dieses Gen codiert T-bet, der als klassischer Transkriptionsfaktor für die TH1-Zellen gilt. Durch Wirkung von T-bet bzw. GATA3 entscheidet sich die Differenzierung zu TH1- bzw. TH2-

Zellen, das Verhältnis der T-bet/GATA3-Expression korreliert mit der IFN- γ -Expression in TH1- Zellen (Yong et al., 2011). Die Deletion des T-bet-Gens in Mäusen führt ohne Allergenexposition zu Eosinophilie in den Atemwegen, TH2-Zytokin-Produktion, Atemwegs-Hyperreagibilität und Remodeling der Atemwege, also Korrelaten sowohl akuten als auch chronischen Asthmas (Finotto et al., 2002).

In anderen Studien wurde ebenfalls bei Probanden mit Asthma über erniedrigtes *TBX21* berichtet (Hamzaoui et al., 2011). Eine verminderte *TBX21*-Expression von Asthmatikern gegenüber gesunden Kontrollen lässt sich gut mit der TH1/2-Dysbalance erklären, jedoch ist es interessant, dass dies auch bei Asthmatikern gegenüber nicht-asthmatischen Rhinitikern der Fall zu sein scheint. Es spräche tendenziell dafür, dass die TH2-Prädominanz bei Asthmatikern im Sputum auf Transkriptomebene stärker ausgeprägt ist als bei Allergikern ohne Asthma.

In der Gegenüberstellung Allergiker mit vs. ohne SCIT ist neben der bereits erwähnten Hochregulation von *PPARG* und *TCF7* bei Probanden mit SCIT auch der Transkriptionsfaktor *SMAD6* hochreguliert gegenüber Probanden ohne Immuntherapie. Die SMAD-Gruppe vermittelt die Signale der TGF-Familie, die, wie bereits geschildert, eine zentrale Rolle bei der Fibrosierung bzw. dem Atemwegs- Remodeling einnimmt (insbesondere TGF β). *SMAD6* scheint dabei eine inhibitorische Funktion einzunehmen. In Bronchialbiopsien von Patienten mit COPD, welche ebenfalls mit Fibrosierung und Remodeling der Atemwege einhergeht, war *SMAD6* signifikant herunterreguliert. Die TGF β -vermittelten Effekte des Umbaus scheinen also mit gestörter Funktion der inhibitorischen SMADs einherzugehen (Springer et al., 2004). Dass *SMAD6* in unserer Analyse bei Probanden mit SCIT verstärkt exprimiert ist, könnte implizieren, dass durch die SCIT dieses Defizit an inhibitorischem SMAD relativiert wird und dies sich im Sinne eines verminderten Remodelings positiv auf die Atemwege der Betroffenen auswirkt.

Aus der selben Familie ist, bei Asthmatikern mit SCIT, *TCF12* (= *HEB*) und sein Paralog *TCF3* hochreguliert. Das zugehörige Protein wird unter anderem im Thymus, in T- und B-Zellen exprimiert und scheint eine wichtige Funktion in der T-Zell-Entwicklung innezuhaben (Barndt et al., 2000). *TCF3* ist in der vorliegenden Analyse bei Asthmatikern gegenüber Allergikern ohne Asthma vermindert exprimiert.

Interessant ist auch die *FOXM1*-Genexpression. Dieses hat eine Bedeutung in der Kontrolle der Schleim-Überproduktion und Becherzell-Differenzierung. So zeigten Ren et al. 2013, dass Allergen-Sensibilisierung in der Lunge die Expression von *FOXM1* in Atemwegs-

Epithelzellen und Entzündungszellen induziert. Durch Deletion des Gens in den genannten Zellen kam es zu einer Abnahme der Entzündung in der Lunge, einer Abnahme der Becherzellmetaplasie und des Atemwegswiderstands in Reaktion auf Hausstaubmilben, darüber hinaus zu einer verminderten Expression von CCL11, CCL24 und den Chemokin-Rezeptoren CCR2 und CXCR3 und dadurch zu einer verminderten Eosinophilen- und Makrophagen-Rekrutierung. Die Deletion des Gens in Dendritischen Zellen führte zu verminderter MHCII und CD86-Expression an der Zelloberfläche und so zu verminderter Produktion von TH2-Zytokinen (Ren et al., 2013). In unserer Analyse war ebendieses *FOXM1* bei allergischen Asthmatikern mit SCIT herabreguliert (siehe Abbildung 27), was somit als Korrelat einer Reduktion der Atemwegsentszündung durch die Therapie interpretiert werden kann.

Zusammengefasst finden sich Hinweise für eine Regulation von Transkriptionsfaktoren, die für eine verstärkte Entzündung und immunologische Aktivität bei Allergikern gegenüber gesunden Kontrollen sprechen (vgl. *TFE3*, *TCF7*), auf die TH1/TH2-Dysbalance hindeuten (*TBX21*), verminderte bzw. nach SCIT verstärkte Treg-Aktivität widerspiegeln (*PPARG*) und mit der Atemwegshyperreagibilität (*FOXJ1*) bzw. dem Atemwegs-Remodeling (*SMAD6*) in Verbindung stehen.

Somit lassen sich im Ansatz auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren die Korrelate wesentlicher Mechanismen des allergischen Asthmas sowie der SCIT nachvollziehen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der qPCR-Validierung

Für einige ausgewählte Gene wurde zur Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse eine qPCR durchgeführt. Das potentiell antiinflammatorisch wirkende, im Abschnitt 4.2.3.1 im Detail diskutierte *SCGB1A1*, welches sich in der Microarray-Analyse bei Probanden mit SCIT stabil in und außerhalb der Saison gegenüber Probanden ohne SCIT hochreguliert zeigte, war auch in der qPCR bei Probanden mit SCIT erhöht exprimiert gegenüber der entsprechenden Vergleichsgruppe ohne SCIT.

Auch die in der Microarray-Analyse beobachteten Expressionsunterschiede des als Vertreter der TH2-Antwort beschriebenen *IL24* war in der qPCR sowohl in der Subgruppe der Probanden mit allergischer Rhinitis wie auch in der Subgruppe der Probanden mit allergischem Asthma nachvollziehbar: Die *IL24*-Genexpression zeigte sich bei Teilnehmern mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT in und außerhalb der Saison erniedrigt und bestätigt somit die Ergebnisse der Microarray-Analyse.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Proteinspiegel-Messung

Auf Proteinebene konnten für ausgewählte Zyto- bzw. Chemokine die auf Transkriptomebene beobachteten Effekte nachvollzogen werden: So zeigte sich IL-8 als klassisch proinflammatorisches Zytokin durch eine SCIT in der Gruppe der Probanden mit allergischer Rhinitis statistisch signifikant vermindert. CCL26, das eine wichtige Rolle beim Remodeling der Atemwege spielt, war, wenn auch knapp oberhalb der Signifikanzgrenze, ebenfalls in der Gruppe mit SCIT erniedrigt. Der Effekt der veränderten TH1/TH2- Balance lässt sich repräsentativ durch das verminderte TH2-Zytokin IL-5 in der Gruppe der Teilnehmer mit allergischer Rhinitis mit SCIT gegenüber solchen ohne SCIT nachvollziehen.

Interessanterweise waren die genannten Effekte in der Subgruppe der Allergiker ohne Asthma deutlicher zu sehen als in der Subgruppe der allergischen Asthmatiker.

Hier könnte spekuliert werden, dass bei den Probanden mit allergischer Rhinitis, die noch vor einer eventuellen Weiterentwicklung zum Asthma bronchiale bereits eine SCIT durchlaufen, die Effekte auf Proteinebene noch deutlicher zu Tage treten als bei schon länger andauernder Erkrankung mit bereits bestehendem Asthma, wo durch die chronische Inflammation die Umbauprozesse bereits weiter fortgeschritten und nur noch schwerer reversibel sind, bzw. im Prozess zwischen Genexpression und Proteinexpression durch unbekannte Faktoren solcher Art Einfluss genommen wird, dass sich die Proteinspiegel der jeweiligen Mediatoren bei allergischen Asthmatikern mit vs. ohne SCIT weniger deutlich unterscheiden als bei Teilnehmern mit ausschließlich allergischer Rhinitis.

Die negative Korrelation zwischen den Proteinspiegeln von SCGB1A1 und CCL26 bzw. zwischen SCGB1A1 und IL-5 unterstreichen die antagonistischen Funktionen in der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis bzw. des allergischen Asthmas und untermauert die antiinflammatorische Rolle von SCGB1A1 gegenüber dem Remodeling-fördernden bzw. der TH2-Antwort zugehörigen CCL26 bzw. IL-5.

Die klinische Relevanz zeigt sich in den Korrelationen zwischen der Proteinspiegelmessung etwa von SCGB1A1 als antiinflammatorisch wirkendem potentiellen Biomarker und IL-24 als Vertreter der TH2-Antwort mit den Ergebnissen des RQLQ-Fragebogens, repräsentativ für die Beeinträchtigung der Lebensqualität durch die Erkrankung.

4.5 Methodik und Studiendesign

Die Anzahl der untersuchten Proben auf dem Microarray für die Transkriptomanalyse belief sich insgesamt auf 40 Proben von 20 Probanden, davon 10 Kontrollproben von 5 gesunden Kontrollprobanden und 30 Proben von 15 Allergikern (vgl. Abbildung 5). Durch die Untersuchung der Subgruppen ergibt sich jedoch eine Reduktion der jeweiligen Anzahl, etwa in der Gruppe der Asthmatiker auf 14 Proben von 7 Probanden insgesamt, von denen 4 eine SCIT hatten, 3 keine SCIT hatten, analog gab es jeweils 4 Nicht-Asthmatische Allergiker mit und ohne SCIT. Während also etwa die Gegenüberstellung aller Allergiker vs. gesunde Kontrollen Sputa von 20 Probanden einschließt, bezieht sich die Analyse in den Subgruppen, beispielsweise in der Gegenüberstellung Asthmatiker mit vs. ohne SCIT, auf Sputa von lediglich 4 bzw. 3 Individuen. Dies ist mit Sicherheit ein limitierender Faktor bezüglich der Aussagekraft. Um wirklich verlässliche Aussagen treffen zu können, wäre eine Wiederholung der Untersuchungen an einer deutlich größeren Kohorte sinnvoll. Jedoch zeichnen sich deutliche Tendenzen ab, die für weitere, gezielte Analysen wertvoll sein können.

Das Probandenkollektiv zeigt sich im Vergleich der jeweiligen Subgruppen weitgehend homogen in Bezug auf Merkmale wie Geschlechterverteilung, Altersverteilung und BMI. Zu beachten ist selbstverständlich, dass es sich bei einem großen Teil der teilnehmenden Probanden um junge, weitgehend gesunde Teilnehmer handelt. Wie die Erhebung des GINA-Scores zeigte, war bei dem überwiegenden Großteil unserer Probanden mit allergischem Asthma das Asthma in einem kontrollierten Zustand, viele nahmen nur Bedarfsmedikation ein und hatten eine relativ kurze Krankheitsvorgeschichte. Dies bringt bezüglich der Aussagekraft der erhobenen Daten Vor- und Nachteile mit sich. Einerseits ist denkbar, dass sich die beschriebenen Unterschiede zum Teil in einem Kollektiv von schwerer oder bereits länger erkrankten Allergikern deutlicher manifestieren. Andererseits ist bekannt, dass die SCIT besonders zu Beginn der Erkrankung eine bessere Wirksamkeit zeigt als nach langem vorherigen Krankheitsverlauf, sodass die Vermutung naheliegt, dass sich mögliche Veränderungen durch die Immuntherapie in einem Kollektiv relativ junger, noch nicht lange erkrankter Allergiker besser nachweisen lassen.

Wichtig, insbesondere für den Vergleich in vs. außerhalb der Pollensaison, ist zudem die Tatsache, dass es sich bei der Mehrheit unserer allergischen Teilnehmer um saisonale Allergiker handelte; in einigen Fällen lag zusätzlich eine Hausstaubmilben- oder Katzenallergie vor, wodurch es durch unter Umständen ganzjährige Allergenexposition zu einer Abschwächung der in vs. out-of-season-Effekte kommen kann. Jedoch ist mittels der

Erhebung des RQLQ-Scores die Abhängigkeit der allergischen Beschwerden vom Zeitpunkt (in/außerhalb der Pollensaison) und damit der saisonale Charakter der Allergie deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 15 im Ergebnisteil, Abschnitt 3.2.3).

Bei zwei unserer allergischen Probanden stellte sich heraus, dass lediglich eine Birken- und keine Gräserpollenallergie vorlag; bei einem Studienteilnehmer eine Eschenpollenallergie. Hier wäre die Wahl der Zeitpunkte der in-season- Untersuchung optimierbar gewesen: der hier verwendete Zeitraum für die in-season-Visite deckt die Hauptbelastungszeit bezüglich Gräserpollen (Mai-Juli) optimal ab und wird damit der Sensibilisierung des Großteils der Probanden gerecht; die typische Hauptbelastungszeit für Birkenpollen und Esche liegt jedoch im Allgemeinen meist etwas früher (Maximum im April, vgl. Abbildung 35). Hier wäre eine Individualisierung im Sinne einer Einbestellung der Probanden im Zeitfenster der Hauptbelastungszeit der bei ihnen jeweils vorliegenden Allergene optimal. Zu beachten sind hierbei allerdings Schwankungen von Jahr zu Jahr, was die Planung erschwert.

Die Wahl des Zeitpunkts der out-of-season-Visite erscheint gelungen angesichts dessen, dass in dem entsprechenden Zeitraum (November 2014-März 2015) kein relevanter Birken- oder Gräser-Pollenflug vorlag und es gelang, alle Probanden vor Wiedereinsetzen einer signifikanten Pollenbelastung zu untersuchen.

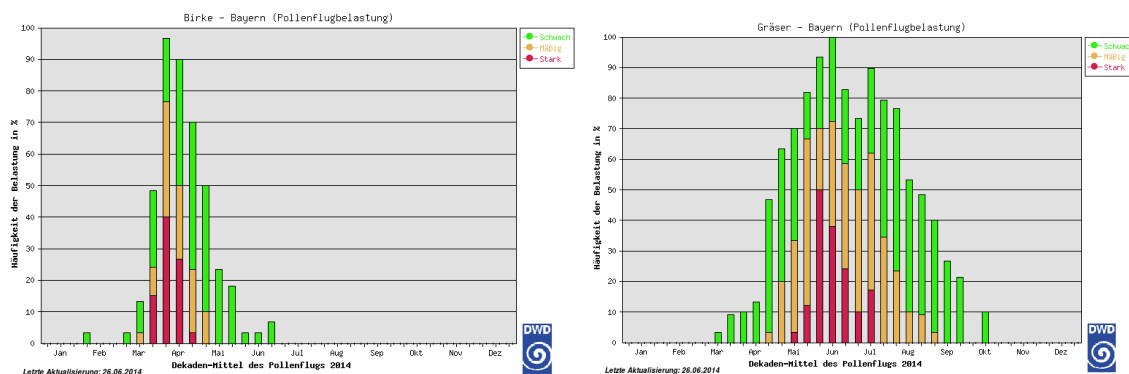


Abbildung 35: Pollenflugbelastung Birke und Gräser in Bayern 2014 (zum Zeitpunkt der in-season-Visite) (Deutscher Wetterdienst, 2014)

5 Zusammenfassung

In der Analyse der Transkriptome der unterschiedlichen Subgruppen konnten wir mehrere relevante Unterschiede bezüglich der Expression zahlreicher Gene zeigen, die für im Rahmen der allergischen Erkrankung pathophysiologisch bedeutsame sekretierte Mediatoren codieren.

So zeigten sich bei Probanden mit Gräser- bzw. Birkenpollenallergie auf Transkriptomebene neben Zeichen der erhöhten Entzündungsaktivität gegenüber gesunden Probanden (verstärkte Expression von Genen für u. a. IL-8, S100A8) insbesondere auch Zeichen der Prädominanz der TH2-Immunantwort durch verstärkte Expression von u. a. *IL4* und *IL13RA2* bzw. verminderte Expression von Vertretern der TH1-Antwort wie *IFN γ* . Zudem konnten weitere potentielle Marker identifiziert werden, die in der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale eine Rolle spielen und somit möglicherweise Gegenstand weiterer Forschung werden könnten oder bereits sind (z. B. *TNFSF14*, *ICAM1*, *MMP9*, *VEGFA*).

In der Untersuchung des bronchialen Sputumtranskriptoms von Probanden mit allergischer Rhinitis ohne Asthma zeigten sich bereits einige Richtung Asthma bronchiale deutende Expressionsmuster (z. B. *MMP9*, *TSLP*), auch wenn der Proband keinerlei asthmatische Symptome vorwies. Hier wären in der Zukunft möglicherweise prognostische Biomarker denkbar, wenn sich entsprechende Korrelationen zum weiteren Verlauf der allergischen Erkrankung herausstellen. Die Entzündungsmarker sowie TH2-Marker waren tendenziell im Sputum von Probanden mit Asthma gegenüber solchen ohne Asthma deutlicher hochreguliert.

Der Effekt der SCIT zeigt sich auf Transkriptomebene durch entsprechende Regulation von Mediatoren, die die Korrelate einer Abnahme der Inflammation allgemein sowie spezifischer der TH2-Prädominanz darstellen, sowie solchen, die auf die Wirkung von Treg-Zellen, ein vermindertes Atemwegs-Remodeling oder Schleimhaut-protective Effekte hinweisen könnten.

Einen Teil der Beobachtungen konnten wir auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren untermauern (z. B. *SMAD6* und *PPARG* durch SCIT hochreguliert) sowie auf Proteinebene nachvollziehen (z. B. *IL8*, *CCL26* und *IL5* durch SCIT vermindert).

Die Arbeit demonstriert darüber hinaus das große Potential des induzierten Sputums für die Analyse der Genexpression von sekretierten Mediatoren und somit für die Identifikation von potentiellen Biomarkern zur zukünftigen Verbesserung der Prognostik, des Therapiemonitorings, und möglicher Therapieansätze.

6 Literaturverzeichnis

- Akdis, C. A., & Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 55(6), 522-530.
- Akdis, M., & Akdis, C. A. (2007). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 119(4), 780-791. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.022
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., & Akdis, C. A. (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), 1567-1575. doi:10.1084/jem.20032058
- Al-Ramli, W., Al Samri, M., & Hamid, Q. (2008). Th-17 cell-related cytokines' potential role in the pathogenesis of severe asthma. *J Asthma*, 45 Suppl 1, 41-44. doi:10.1080/02770900802594759
- Alcorn, J. F., Crowe, C. R., & Kolls, J. K. (2010). TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol*, 72, 495-516. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135926
- Alexis, N. E., Brickey, W. J., Lay, J. C., Wang, Y., Roubey, R. A., Ting, J. P., & Peden, D. B. (2008). Development of an inhaled endotoxin challenge protocol for characterizing evoked cell surface phenotype and genomic responses of airway cells in allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 100(3), 206-215. doi:10.1016/S1081-1206(10)60444-9
- Anderson, G. P. (2008). Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*, 372(9643), 1107-1119. doi:10.1016/S0140-6736(08)61452-X
- Athie-Morales, V., Smits, H. H., Cantrell, D. A., & Hilkens, C. M. (2004). Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol*, 172(1), 61-69.
- Bacci, E., Di Franco, A., Bartoli, M. L., Carnevali, S., Cianchetti, S., Dente, F. L., Giannini, D., Vagaggini, B., Ruocco, L., & Paggiaro, P. L. (2002). Comparison of anti-inflammatory and clinical effects of beclomethasone dipropionate and salmeterol in moderate asthma. *Eur Respir J*, 20(1), 66-72.
- Baigelman, W., Chodosh, S., Pizzuto, D., & Cupples, L. A. (1983). Sputum and blood eosinophils during corticosteroid treatment of acute exacerbations of asthma. *Am J Med*, 75(6), 929-936.
- Baines, K. J., Simpson, J. L., Wood, L. G., Scott, R. J., Fibbens, N. L., Powell, H., Cowan, D. C., Taylor, D. R., Cowan, J. O., & Gibson, P. G. (2014). Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, 133(4), 997-1007. doi:10.1016/j.jaci.2013.12.1091
- Baines, K. J., Simpson, J. L., Wood, L. G., Scott, R. J., & Gibson, P. G. (2011). Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J Allergy Clin Immunol*, 127(1), 153-160, 160 e151-159. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.024
- Bakhru, P. a. O., Carla and Schulten, Veronique M and Hinz, Denise and Tripple, Victoria and Alam, Rafeul and Broide, David H and Frazier, April and Sidney, John and Peters, Bjoern and others. (2014). Distinct Patterns and Magnitude Of T Cell Responses Are Associated With Seasonal Exposure To Timothy Grass Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), AB137.
- Barndt, R. J., Dai, M., & Zhuang, Y. (2000). Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Mol Cell Biol*, 20(18), 6677-6685.
- Barra, M. M., Richards, D. M., Hansson, J., Hofer, A. C., Delacher, M., Hettinger, J., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2015). Transcription Factor 7 Limits Regulatory T Cell

- Generation in the Thymus. *J Immunol*, 195(7), 3058-3070. doi:10.4049/jimmunol.1500821
- Bartemes, K. R., Kephart, G. M., Fox, S. J., & Kita, H. (2014). Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 134(3), 671-678 e674. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.024
- Bauchau, V., & Durham, S. R. (2004). Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*, 24(5), 758-764. doi:10.1183/09031936.04.00013904
- Baumann, R., Rabaszowski, M., Stenin, I., Tilgner, L., Scheckenbach, K., Wiltfang, J., Schipper, J., Chaker, A., & Wagenmann, M. (2013). Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. *Am J Rhinol Allergy*, 27(4), 266-272. doi:10.2500/ajra.2013.27.3913
- Beale, J., Jayaraman, A., Jackson, D. J., Macintyre, J. D. R., Edwards, M. R., Walton, R. P., Zhu, J., Man Ching, Y., Shamji, B., Edwards, M., Westwick, J., Cousins, D. J., Yi Hwang, Y., McKenzie, A., Johnston, S. L., & Bartlett, N. W. (2014). Rhinovirus-induced IL-25 in asthma exacerbation drives type 2 immunity and allergic pulmonary inflammation. *Sci Transl Med*, 6(256), 256ra134. doi:10.1126/scitranslmed.3009124
- Benson, M., Carlsson, B., Carlsson, L. M., Wennergren, G., & Cardell, L. O. (2002). Increased expression of Vascular Endothelial Growth Factor-A in seasonal allergic rhinitis. *Cytokine*, 20(6), 268-273.
- Boonpiyathad, S., Pornsuriyasak, P., Buranapraditkun, S., & Klaewsongkram, J. (2013). Interleukin-2 levels in exhaled breath condensates, asthma severity, and asthma control in nonallergic asthma. *Allergy Asthma Proc*, 34(5), e35-41. doi:10.2500/aap.2013.34.3680
- Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A. A., Denburg, J., Fokkens, W. J., Togias, A., Zuberbier, T., Baena-Cagnani, C. E., Canonica, G. W., van Weel, C., Agache, I., Ait-Khaled, N., Bachert, C., Blaiss, M. S., Bonini, S., Boulet, L. P., Bousquet, P. J., Camargos, P., Carlsen, K. H., Chen, Y., Custovic, A., Dahl, R., Demoly, P., Douagui, H., Durham, S. R., van Wijk, R. G., Kalayci, O., Kaliner, M. A., Kim, Y. Y., Kowalski, M. L., Kuna, P., Le, L. T., Lemiere, C., Li, J., Lockey, R. F., Mavale-Manuel, S., Meltzer, E. O., Mohammad, Y., Mullol, J., Naclerio, R., O'Hehir, R. E., Ohta, K., Ouedraogo, S., Palkonen, S., Papadopoulos, N., Passalacqua, G., Pawankar, R., Popov, T. A., Rabe, K. F., Rosado-Pinto, J., Scadding, G. K., Simons, F. E., Toskala, E., Valovirta, E., van Cauwenberge, P., Wang, D. Y., Wickman, M., Yawn, B. P., Yorgancioglu, A., Yusuf, O. M., Zar, H., Annesi-Maesano, I., Bateman, E. D., Ben Kheder, A., Boakye, D. A., Bouchard, J., Burney, P., Busse, W. W., Chan-Yeung, M., Chavannes, N. H., Chuchalin, A., Dolen, W. K., Emuzyte, R., Grouse, L., Humbert, M., Jackson, C., Johnston, S. L., Keith, P. K., Kemp, J. P., Klossek, J. M., Larenas-Linnemann, D., Lipworth, B., Malo, J. L., Marshall, G. D., Naspitz, C., Nekam, K., Niggemann, B., Nizankowska-Mogilnicka, E., Okamoto, Y., Orru, M. P., Potter, P., Price, D., Stoloff, S. W., Vandenplas, O., Viegi, G., Williams, D., World Health, O., Galen, & AllerGen. (2008). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*, 63 Suppl 86, 8-160. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x
- Bousquet, J., Lockey, R., & Malling, H. J. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol*, 102(4 Pt 1), 558-562.
- Bradley, L. M., Haynes, L., & Swain, S. L. (2005). IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol*, 26(3), 172-176. doi:10.1016/j.it.2005.01.004
- Braza, F., Chesne, J., Durand, M., Dirou, S., Brosseau, C., Mahay, G., Cheminant, M. A., Magnan, A., & Brouard, S. (2015). A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-

- induced allergic airway inflammation. *Allergy*, 70(11), 1421-1431. doi:10.1111/all.12697
- Brightling, C. E., Green, R. H., & Pavord, I. D. (2005). Biomarkers predicting response to corticosteroid therapy in asthma. *Treat Respir Med*, 4(5), 309-316.
- Calderon, M. A., Alves, B., Jacobson, M., Hurwitz, B., Sheikh, A., & Durham, S. (2007). Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD001936. doi:10.1002/14651858.CD001936.pub2
- Canguven, O., & Albayrak, S. (2011). Do low testosterone levels contribute to the pathogenesis of asthma? *Med Hypotheses*, 76(4), 585-588. doi:10.1016/j.mehy.2011.01.006
- Cataldo, D. D., Bettiol, J., Noel, A., Bartsch, P., Foidart, J. M., & Louis, R. (2002). Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. *Chest*, 122(5), 1553-1559.
- Chaker, A. M., Zissler, U. M., Wagenmann, M., & Schmidt-Weber, C. (2017). Biomarkers in Allergic Airway Disease: Simply Complex. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 79(1-2), 72-77. doi:10.1159/000455725
- Chanez, P., Wenzel, S. E., Anderson, G. P., Anto, J. M., Bel, E. H., Boulet, L. P., Brightling, C. E., Busse, W. W., Castro, M., Dahlen, B., Dahlen, S. E., Fabbri, L. M., Holgate, S. T., Humbert, M., Gaga, M., Joos, G. F., Levy, B., Rabe, K. F., Sterk, P. J., Wilson, S. J., & Vachier, I. (2007). Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol*, 119(6), 1337-1348. doi:10.1016/j.jaci.2006.11.702
- Chen, W. (2011). Tregs in immunotherapy: opportunities and challenges. *Immunotherapy*, 3(8), 911-914. doi:10.2217/imt.11.79
- Choi, J. M., & Bothwell, A. L. (2012). The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol Cells*, 33(3), 217-222. doi:10.1007/s10059-012-2297-y
- Coleman, J. M., Naik, C., Holguin, F., Ray, A., Ray, P., Trudeau, J. B., & Wenzel, S. E. (2012). Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax*, 67(12), 1061-1066. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201634
- Compalati, E., Ridolo, E., Passalacqua, G., Braido, F., Villa, E., & Canonica, G. W. (2010). The link between allergic rhinitis and asthma: the united airways disease. *Expert Rev Clin Immunol*, 6(3), 413-423. doi:10.1586/eci.10.15
- Corren, J., Lemanske, R. F., Hanania, N. A., Korenblat, P. E., Parsey, M. V., Arron, J. R., Harris, J. M., Scheerens, H., Wu, L. C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M. D., Bohen, S. P., & Matthews, J. G. (2011). Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med*, 365(12), 1088-1098. doi:10.1056/NEJMoa1106469
- de Kluijver, J., Evertse, C. E., Schrumpf, J. A., van der Veen, H., Zwinderman, A. H., Hiemstra, P. S., Rabe, K. F., & Sterk, P. J. (2002). Asymptomatic worsening of airway inflammation during low-dose allergen exposure in asthma: protection by inhaled steroids. *Am J Respir Crit Care Med*, 166(3), 294-300. doi:10.1164/rccm.2112097
- Deutscher Wetterdienst. (2014). Pollenflugstatistik. Retrieved from <http://www.dwd.de/DE/leistungen/pollen/pollenstatistik.html>
- Di Caro, V., D'Anneo, A., Phillips, B., Engman, C., Harnaha, J., Lakomy, R., Styche, A., Trucco, M., & Giannoukakis, N. (2011). Interleukin-7 matures suppressive CD127(+) forkhead box P3 (FoxP3)(+) T cells into CD127(-) CD25(high) FoxP3(+) regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*, 165(1), 60-76. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04334.x
- Di Valentin, E., Crahay, C., Garbacki, N., Hennuy, B., Gueders, M., Noel, A., Foidart, J. M., Grooten, J., Colige, A., Piette, J., & Cataldo, D. (2009). New asthma biomarkers:

- lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296(2), L185-197. doi:10.1152/ajplung.90367.2008
- Diamant, Z., Boot, J. D., Mantzouranis, E., Flohr, R., Sterk, P. J., & Gerth van Wijk, R. (2010). Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther*, 23(6), 468-481. doi:10.1016/j.pupt.2010.06.006
- Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S. J., Hamid, Q. A., & Nouri-Aria, K. T. (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*, 341(7), 468-475. doi:10.1056/NEJM199908123410702
- Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Willheim, M., Wiedermann, U., Schenk, S., Klotz, F., Ebner, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1997). Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*, 27(9), 1007-1015.
- Efthimiadis, A., Pizzichini, M. M., Pizzichini, E., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1997). Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline. *Eur Respir J*, 10(6), 1336-1340.
- Elkholy, M. M., Khedr, M. H., Halawa, A., & Elbaramawy, A. (2012). Impact of allergic rhinitis on quality of life in patients with bronchial asthma. *Int J Health Sci (Qassim)*, 6(2), 194-202.
- Eng, P. A., Borer-Reinhold, M., Heijnen, I. A., & Gnehm, H. P. (2006). Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood. *Allergy*, 61(2), 198-201. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01011.x
- Evans, C. M., Raclawska, D. S., Ttofali, F., Liptzin, D. R., Fletcher, A. A., Harper, D. N., McGing, M. A., McElwee, M. M., Williams, O. W., Sanchez, E., Roy, M. G., Kindrachuk, K. N., Wynn, T. A., Eltzschig, H. K., Blackburn, M. R., Tuvim, M. J., Janssen, W. J., Schwartz, D. A., & Dickey, B. F. (2015). The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat Commun*, 6, 6281. doi:10.1038/ncomms7281
- Fahy, J. V. (2009). Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc*, 6(3), 256-259. doi:10.1513/pats.200808-087RM
- Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J. N., Qin, S., Lehr, H. A., Green, F. H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P. R., Szabo, S. J., Drazen, J. M., De Sanctis, G. T., & Glimcher, L. H. (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*, 295(5553), 336-338. doi:10.1126/science.1065544
- Fliege, H., Rose, M., Arck, P., Walter, O. B., Kocalevent, R. D., Weber, C., & Klapp, B. F. (2005). The Perceived Stress Questionnaire (PSQ) reconsidered: validation and reference values from different clinical and healthy adult samples. *Psychosom Med*, 67(1), 78-88. doi:10.1097/01.psy.0000151491.80178.78
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., & Bromberg, J. S. (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*, 4(10), 1614-1627. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x
- Gavala, M. L., Bertics, P. J., & Gern, J. E. (2011). Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma. *Immunol Rev*, 242(1), 69-90. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01031.x
- Gilain, L., Guichard, C., Beaujon, G., Mom, T., Monneyron, E., Saleh, H., Advenier, D., & Caillaud, D. (2000). [Nasal soluble levels of ICAM-1 in allergic rhinitis]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 117(2), 91-97.
- Gong, W., Wang, X., Zhang, Y., Hao, J., Xing, C., Chu, Q., Wang, G., Zhao, J., Wang, J., Dong, Q., Liu, T., Zhang, Y., & Dong, L. (2014). Interleukin-20 promotes airway

- remodeling in asthma. *Inflammation*, 37(6), 2099-2105. doi:10.1007/s10753-014-9944-8
- Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Peled, A., Delaney, T., Coyle, A. J., & Gutierrez-Ramos, J. C. (2000). Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol*, 165(1), 499-508.
- Green, R. H., Brightling, C. E., McKenna, S., Hargadon, B., Parker, D., Bradding, P., Wardlaw, A. J., & Pavord, I. D. (2002). Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*, 360(9347), 1715-1721. doi:10.1016/S0140-6736(02)11679-5
- Greve, J. M., Davis, G., Meyer, A. M., Forte, C. P., Yost, S. C., Marlor, C. W., Kamarck, M. E., & McClelland, A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56(5), 839-847.
- Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A., Odom, S., Rivera, J., Colombo, M. P., & Pucillo, C. E. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*, 29(5), 771-781. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.018
- Guerra, S., Vasquez, M. M., Spangenberg, A., Halonen, M., & Martin, R. J. (2016). Club cell secretory protein in serum and bronchoalveolar lavage of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 138(3), 932-934 e931. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.047
- Haftenberger, M., Laussmann, D., Ellert, U., Kalcklosch, M., Langen, U., Schlaud, M., Schmitz, R., & Thamm, M. (2013). [Prevalence of sensitisation to aeroallergens and food allergens: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 687-697. doi:10.1007/s00103-012-1658-1
- Hamzaoui, A., Maalmi, H., Berraies, A., Abid, H., Ammar, J., & Hamzaoui, K. (2011). Transcriptional characteristics of CD4 T cells in young asthmatic children: RORC and FOXP3 axis. *J Inflamm Res*, 4, 139-146. doi:10.2147/JIR.S25314
- Hanania, N. A., Korenblat, P., Chapman, K. R., Bateman, E. D., Kopecky, P., Paggiaro, P., Yokoyama, A., Olsson, J., Gray, S., Holweg, C. T., Eisner, M., Asare, C., Fischer, S. K., Peng, K., Putnam, W. S., & Matthews, J. G. (2016). Efficacy and safety of lebrikizumab in patients with uncontrolled asthma (LAVOLTA I and LAVOLTA II): replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet Respir Med*, 4(10), 781-796. doi:10.1016/S2213-2600(16)30265-X
- Hedger, M. P., Drummond, A. E., Robertson, D. M., Risbridger, G. P., & de Kretser, D. M. (1989). Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 61(1), 133-138.
- Herro, R., Da Silva Antunes, R., Aguilera, A. R., Tamada, K., & Croft, M. (2015). Tumor necrosis factor superfamily 14 (LIGHT) controls thymic stromal lymphopoietin to drive pulmonary fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*, 136(3), 757-768. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1936
- Hoshino, M., Nakamura, Y., Sim, J., Shimojo, J., & Isogai, S. (1998). Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 102(5), 783-788.
- Ito, K., Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2006). Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*, 117(3), 522-543. doi:10.1016/j.jaci.2006.01.032
- Jacobsen, L., Wahn, U., & Bilo, M. B. (2012). Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clin Transl Allergy*, 2, 8. doi:10.1186/2045-7022-2-8

- Jacoby, D. B., Costello, R. M., & Fryer, A. D. (2001). Eosinophil recruitment to the airway nerves. *J Allergy Clin Immunol*, *107*(2), 211-218. doi:10.1067/mai.2001.112940
- Jatakanon, A., Lim, S., & Barnes, P. J. (2000). Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*, *161*(1), 64-72. doi:10.1164/ajrccm.161.1.9809100
- Jeong, H. J., Shin, S. Y., Oh, H. A., Kim, M. H., Cho, J. S., & Kim, H. M. (2011). IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis. *J Pathol*, *224*(4), 553-563. doi:10.1002/path.2899
- Juniper, E. F., Thompson, A. K., Ferrie, P. J., & Roberts, J. N. (2000). Development and validation of the mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *Clin Exp Allergy*, *30*(1), 132-140.
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., & Muller, U. R. (1995). Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol*, *154*(8), 4187-4194.
- Kang, J. H., Hwang, S. M., & Chung, I. Y. (2015). S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor-kappaB pathways. *Immunology*, *144*(1), 79-90. doi:10.1111/imm.12352
- Katila, H., Cantell, K., Appelberg, B., & Rimon, R. (1993). Is there a seasonal variation in the interferon-producing capacity of healthy subjects? *J Interferon Res*, *13*(3), 233-234.
- Kato, A., Favoreto, S., Jr., Avila, P. C., & Schleimer, R. P. (2007). TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol*, *179*(2), 1080-1087.
- Kawaguchi, M., Kokubu, F., Fujita, J., Huang, S. K., & Hizawa, N. (2009). Role of interleukin-17F in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets*, *8*(5), 383-389.
- Kohan, M., Puxeddu, I., Reich, R., Levi-Schaffer, F., & Berkman, N. (2010). Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential profibrogenic effects on human lung fibroblasts. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *104*(1), 66-72. doi:10.1016/j.anai.2009.11.003
- la Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., & Girolomoni, G. (2003). Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol*, *73*(3), 339-343.
- Laberge, S., Ernst, P., Ghaffar, O., Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., Center, D. M., & Hamid, Q. (1997). Increased expression of interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *17*(2), 193-202. doi:10.1165/ajrcmb.17.2.2750
- Laffont, S., Blanquart, E., Savignac, M., Cenac, C., Laverny, G., Metzger, D., Girard, J. P., Belz, G. T., Pelletier, L., Seillet, C., & Guery, J. C. (2017). Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med*, *214*(6), 1581-1592. doi:10.1084/jem.20161807
- Langen, U., Schmitz, R., & Steppuhn, H. (2013). [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, *56*(5-6), 698-706. doi:10.1007/s00103-012-1652-7
- Larche, M., Robinson, D. S., & Kay, A. B. (2003). The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *111*(3), 450-463; quiz 464.
- Larose, M. C., Chakir, J., Archambault, A. S., Joubert, P., Provost, V., Laviolette, M., & Flamand, N. (2015). Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe

- eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 136(4), 904-913. doi:10.1016/j.jaci.2015.02.039
- Leckie, M. J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B. J., Walls, C. M., Mathur, A. K., Cowley, H. C., Chung, K. F., Djukanovic, R., Hansel, T. T., Holgate, S. T., Sterk, P. J., & Barnes, P. J. (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 356(9248), 2144-2148.
- Lee, C. G., Link, H., Baluk, P., Homer, R. J., Chapoval, S., Bhandari, V., Kang, M. J., Cohn, L., Kim, Y. K., McDonald, D. M., & Elias, J. A. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med*, 10(10), 1095-1103. doi:10.1038/nm1105
- Levenstein, S., Prantera, C., Varvo, V., Scribano, M. L., Berto, E., Luzi, C., & Andreoli, A. (1993). Development of the Perceived Stress Questionnaire: a new tool for psychosomatic research. *J Psychosom Res*, 37(1), 19-32.
- Li, J. G., Du, Y. M., Yan, Z. D., Yan, J., Zhuansun, Y. X., Chen, R., Zhang, W., Feng, S. L., & Ran, P. X. (2016). CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. *Exp Ther Med*, 11(3), 878-884. doi:10.3892/etm.2016.2989
- Li, W., Gao, P., Zhi, Y., Xu, W., Wu, Y., Yin, J., & Zhang, J. (2015). Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. *Respir Res*, 16, 57. doi:10.1186/s12931-015-0218-2
- Liao, S. C., Cheng, Y. C., Wang, Y. C., Wang, C. W., Yang, S. M., Yu, C. K., Shieh, C. C., Cheng, K. C., Lee, M. F., Chiang, S. R., Shieh, J. M., & Chang, M. S. (2004). IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. *J Immunol*, 173(11), 6712-6718.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Louis, R., Lau, L. C., Bron, A. O., Roldaan, A. C., Radermecker, M., & Djukanovic, R. (2000). The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(1), 9-16. doi:10.1164/ajrccm.161.1.9802048
- Lundy, S. K., Berlin, A. A., Martens, T. F., & Lukacs, N. W. (2005). Deficiency of regulatory B cells increases allergic airway inflammation. *Inflamm Res*, 54(12), 514-521. doi:10.1007/s00011-005-1387-0
- Luskin, A. T. (2005). What the asthma end points we know and love do and do not tell us. *J Allergy Clin Immunol*, 115(4 Suppl), S539-545. doi:10.1016/j.jaci.2005.01.027
- Ma, Y. N., Wang, J., Lee, Y. L., Ren, W. H., Lv, X. F., He, Q. C., & Dong, G. H. (2015). Association of urine CC16 and lung function and asthma in Chinese children. *Allergy Asthma Proc*, 36(4), 59-64. doi:10.2500/aap.2015.36.3853
- Mandal, A. K., Zhang, Z., Ray, R., Choi, M. S., Chowdhury, B., Pattabiraman, N., & Mukherjee, A. B. (2004). Uteroglobin represses allergen-induced inflammatory response by blocking PGD2 receptor-mediated functions. *J Exp Med*, 199(10), 1317-1330. doi:10.1084/jem.20031666
- Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J., & Mattoli, S. (1992). Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 89(5), 1001-1009.
- Marshall, J. S., Leal-Berumen, I., Nielsen, L., Glibetic, M., & Jordana, M. (1996). Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J Clin Invest*, 97(4), 1122-1128. doi:10.1172/JCI118506

- Matsune, S. (2012). Allergic rhinitis and vascular endothelial growth factor. *J Nippon Med Sch*, 79(3), 170-175.
- McKenzie, A. N. (2014). Type-2 innate lymphoid cells in asthma and allergy. *Ann Am Thorac Soc*, 11 Suppl 5, S263-270. doi:10.1513/AnnalsATS.201403-097AW
- Merrell, K., Wells, S., Henderson, A., Gorman, J., Alt, F., Stall, A., & Calame, K. (1997). The absence of the transcription activator TFE3 impairs activation of B cells in vivo. *Mol Cell Biol*, 17(6), 3335-3344.
- Miljkovic, D., Bassiouni, A., Cooksley, C., Ou, J., Hauben, E., Wormald, P. J., & Vreugde, S. (2014). Association between group 2 innate lymphoid cells enrichment, nasal polyps and allergy in chronic rhinosinusitis. *Allergy*, 69(9), 1154-1161. doi:10.1111/all.12440
- Mir, E., Panjabi, C., & Shah, A. (2012). Impact of allergic rhinitis in school going children. *Asia Pac Allergy*, 2(2), 93-100. doi:10.5415/apallergy.2012.2.2.93
- Monteseirin, J. (2009). Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19(5), 340-354.
- Mori, S., Pawankar, R., Ozu, C., Nonaka, M., Yagi, T., & Okubo, K. (2012). Expression and Roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 in Allergic Nasal Mucosa. *Allergy Asthma Immunol Res*, 4(4), 231-239. doi:10.4168/air.2012.4.4.231
- Muro, S., Taha, R., Tsicopoulos, A., Olivenstein, R., Tonnel, A. B., Christodouloupoulos, P., Wallaert, B., & Hamid, Q. (2001). Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 108(6), 970-975. doi:10.1067/mai.2001.119556
- Murray, C. S., Simpson, A., & Custovic, A. (2004). Allergens, viruses, and asthma exacerbations. *Proc Am Thorac Soc*, 1(2), 99-104. doi:10.1513/pats.2306027
- Nakajima, A., Watanabe, N., Yoshino, S., Yagita, H., Okumura, K., & Azuma, M. (1997). Requirement of CD28-CD86 co-stimulation in the interaction between antigen-primed T helper type 2 and B cells. *Int Immunol*, 9(5), 637-644.
- Nicholas, B., & Djukanovic, R. (2009). Induced sputum: a window to lung pathology. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4), 868-872. doi:10.1042/BST0370868
- Nie, W., Xue, C., Chen, J., & Xiu, Q. (2013). Secretoglobin 1A member 1 (SCGB1A1) +38A/G polymorphism is associated with asthma risk: a meta-analysis. *Gene*, 528(2), 304-308. doi:10.1016/j.gene.2013.06.049
- Nocker, R. E., Schoonbrood, D. F., van de Graaf, E. A., Hack, C. E., Lutter, R., Jansen, H. M., & Out, T. A. (1996). Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 109(2), 183-191.
- Park, S. J., Wiekowski, M. T., Lira, S. A., & Mehrad, B. (2006). Neutrophils regulate airway responses in a model of fungal allergic airways disease. *J Immunol*, 176(4), 2538-2545.
- Passalacqua, G., Ciprandi, G., & Canonica, G. W. (2000). United airways disease: therapeutic aspects. *Thorax*, 55 Suppl 2, S26-27.
- Paulissen, G., Rocks, N., Gueders, M. M., Crahay, C., Quesada-Calvo, F., Bekaert, S., Hacha, J., El Hour, M., Foidart, J. M., Noel, A., & Cataldo, D. D. (2009). Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases. *Respir Res*, 10, 127. doi:10.1186/1465-9921-10-127
- Peters, M. C., Mekonnen, Z. K., Yuan, S., Bhakta, N. R., Woodruff, P. G., & Fahy, J. V. (2014). Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 133(2), 388-394. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.036
- Petraglia, F., Sacerdote, P., Cossarizza, A., Angioni, S., Genazzani, A. D., Franceschi, C., Muscettola, M., & Grasso, G. (1991). Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon-gamma production. *J Clin Endocrinol Metab*, 72(2), 496-502. doi:10.1210/jcem-72-2-496

- Pfaar, O., Bachert, C., Bufe, A., Buhl, R., Ebner, C., Eng, P., Friedrichs, F., Fuchs, T., Hamelmann, E., Hartwig-Bade, D., Hering, T., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M. V., Merk, H., Rabe, U., Saloga, J., Schmid-Grendelmeier, P., Schuster, A., Schwerk, N., Sitter, H., Umpfenbach, U., Wedi, B., Wohrl, S., Worm, M., Kleine-Tebbe, J., Kaul, S., & Schwalfenberg, A. (2014). Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (OGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto- Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo J Int*, 23(8), 282-319. doi:10.1007/s40629-014-0032-2
- Pfaffl, M. W. (2004). Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1(04), 92-95.
- Pham, D. L., Yoon, M. G., Ban, G. Y., Kim, S. H., Kim, M. A., Ye, Y. M., Shin, Y. S., & Park, H. S. (2015). Serum S100A8 and S100A9 Enhance Innate Immune Responses in the Pathogenesis of Baker's Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 168(2), 138-146. doi:10.1159/000441678
- Ren, X., Shah, T. A., Ustiyani, V., Zhang, Y., Shinn, J., Chen, G., Whitsett, J. A., Kalin, T. V., & Kalinichenko, V. V. (2013). FOXM1 promotes allergen-induced goblet cell metaplasia and pulmonary inflammation. *Mol Cell Biol*, 33(2), 371-386. doi:10.1128/MCB.00934-12
- Renz, H., Biedermann, T., Bufe, A., Eberlein, B., Jappe, U., Ollert, M., Petersen, A., Kleine-Tebbe, J., Raulf-Heimsoth, M., & Saloga, J. (2010). In-vitro-Allergiediagnostik. *Allergo Journal*, 19(2), 110-128.
- Robinson, D. S. (2009). Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy*, 39(9), 1314-1323. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x
- Rothkirch, S. P. H. (2017). *Durchflusszytometrische Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im Sputum und peripheren Blut*. (Dissertation), Technische Universität München, München.
- Rozenfeld, J., Efrati, E., Adler, L., Tal, O., Carrithers, S. L., Alper, S. L., & Zelikovic, I. (2011). Transcriptional regulation of the pendrin gene. *Cell Physiol Biochem*, 28(3), 385-396. doi:10.1159/000335100
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., & Tessier, P. A. (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*, 170(6), 3233-3242.
- Schaller, M. A., Kallal, L. E., & Lukacs, N. W. (2008). A key role for CC chemokine receptor 1 in T-cell-mediated respiratory inflammation. *Am J Pathol*, 172(2), 386-394. doi:10.2353/ajpath.2008.070537
- Schmalzer, M., Broggi, M. A., Lagarde, N., Stocklin, B. F., King, C. G., Finke, D., & Rossi, S. W. (2015). IL-7R signaling in regulatory T cells maintains peripheral and allograft tolerance in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(43), 13330-13335. doi:10.1073/pnas.1510045112
- Schmidt-Weber, C. B., & Blaser, K. (2005). New insights into the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5(6), 525-530.

- Schoenwetter, W. F., Dupclay, L., Jr., Appajosyula, S., Botteman, M. F., & Pashos, C. L. (2004). Economic impact and quality-of-life burden of allergic rhinitis. *Curr Med Res Opin*, *20*(3), 305-317. doi:10.1185/030079903125003053
- Segerer, S. E., Muller, N., Brandt, J., Kapp, M., Dietl, J., Reichardt, H. M., Rieger, L., & Kammerer, U. (2008). The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod Biol Endocrinol*, *6*, 17. doi:10.1186/1477-7827-6-17
- Semik-Orzech, A., Barczyk, A., Wiaderkiewicz, R., & Pierzchala, W. (2009). Interleukin 17 and RANTES levels in induced sputum of patients with allergic rhinitis after a single nasal allergen challenge. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *103*(5), 418-424. doi:10.1016/S1081-1206(10)60362-6
- Seshadri, S., Lu, X., Purkey, M. R., Homma, T., Choi, A. W., Carter, R., Suh, L., Norton, J., Harris, K. E., Conley, D. B., Kato, A., Avila, P. C., Czarnocka, B., Kopp, P. A., Peters, A. T., Grammer, L. C., Chandra, R. K., Tan, B. K., Liu, Z., Kern, R. C., & Schleimer, R. P. (2015). Increased expression of the epithelial anion transporter pendrin/SLC26A4 in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*, *136*(6), 1548-1558 e1547. doi:10.1016/j.jaci.2015.05.024
- Shamji, M. H., Kappen, J. H., Akdis, M., Jensen-Jarolim, E., Knol, E. F., Kleine-Tebbe, J., Bohle, B., Chaker, A. M., Till, S. J., Valenta, R., Poulsen, L. K., Calderon, M. A., Demoly, P., Pfaar, O., Jacobsen, L., Durham, S. R., & Schmidt-Weber, C. B. (2017). Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*. doi:10.1111/all.13138
- Shijubo, N., Itoh, Y., Yamaguchi, T., Sugaya, F., Hirasawa, M., Yamada, T., Kawai, T., & Abe, S. (1999). Serum levels of Clara cell 10-kDa protein are decreased in patients with asthma. *Lung*, *177*(1), 45-52.
- Shimizu, Y., & Dobashi, K. (2012). CC-chemokine CCL15 expression and possible implications for the pathogenesis of IgE-related severe asthma. *Mediators Inflamm*, *2012*, 475253. doi:10.1155/2012/475253
- Shin, E. K., Lee, S. H., Cho, S. H., Jung, S., Yoon, S. H., Park, S. W., Park, J. S., Uh, S. T., Kim, Y. K., Kim, Y. H., Choi, J. S., Park, B. L., Shin, H. D., & Park, C. S. (2010). Association between colony-stimulating factor 1 receptor gene polymorphisms and asthma risk. *Hum Genet*, *128*(3), 293-302. doi:10.1007/s00439-010-0850-3
- Simard, J. C., Cesaro, A., Chapeton-Montes, J., Tardif, M., Antoine, F., Girard, D., & Tessier, P. A. (2013). S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1). *PLoS One*, *8*(8), e72138. doi:10.1371/journal.pone.0072138
- Simonetta, F., Gestermann, N., Martinet, K. Z., Boniotto, M., Tissieres, P., Seddon, B., & Bourgeois, C. (2012). Interleukin-7 influences FOXP3+CD4+ regulatory T cells peripheral homeostasis. *PLoS One*, *7*(5), e36596. doi:10.1371/journal.pone.0036596
- Singh, M., Lee, S. H., Porter, P., Xu, C., Ohno, A., Atmar, R. L., Greenberg, S. B., Bandi, V., Gern, J., Amineva, S., Aminev, A., Skern, T., Smithwick, P., Perusich, S., Barrow, N., Roberts, L., Corry, D. B., & Kheradmand, F. (2010). Human rhinovirus proteinase 2A induces TH1 and TH2 immunity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, *125*(6), 1369-1378 e1362. doi:10.1016/j.jaci.2010.02.035
- Sonnenberg, G. F., Nair, M. G., Kim, T. J., Zaph, C., Fouser, L. A., & Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med*, *207*(6), 1293-1305. doi:10.1084/jem.20092054

- Spanevello, A., Migliori, G. B., Sharara, A., Ballardini, L., Bridge, P., Pisati, P., Neri, M., & Ind, P. W. (1997). Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy*, *27*(10), 1138-1144.
- Springer, J., Scholz, F. R., Peiser, C., Groneberg, D. A., & Fischer, A. (2004). SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke. *Biol Chem*, *385*(7), 649-653. doi:10.1515/BC.2004.080
- Stanciu, L. A., & Djukanovic, R. (1998). The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J*, *11*(4), 949-957.
- Stone, C. A., Jr., & Miller, E. K. (2015). Understanding the Association of Human Rhinovirus with Asthma. *Clin Vaccine Immunol*, *23*(1), 6-10. doi:10.1128/CVI.00414-15
- Sun, J., Wang, J., Pefanis, E., Chao, J., Rothschild, G., Tachibana, I., Chen, J. K., Ivanov, II, Rabadan, R., Takeda, Y., & Basu, U. (2015). Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells. *Cell Rep*, *13*(6), 1110-1117. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.070
- The Global Initiative for Asthma. (2012). Pocket guide for asthma management and prevention (updated 2012). *Global Initiative for Asthma (GINA)*.
- Till, S. J., Francis, J. N., Nouri-Aria, K., & Durham, S. R. (2004). Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, *113*(6), 1025-1034; quiz 1035. doi:10.1016/j.jaci.2004.03.024
- Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Overbergh, L., Dupont, L. J., Ceuppens, J. L., & Bullens, D. M. (2006). Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*, *61*(3), 202-208. doi:10.1136/thx.2005.052399
- Valdesoiro, L., Bosque, M., Marco, M. T., Asensio, O., Anton, J., & Larramona, H. (2004). [Allergic rhinitis and bronchial hyperreactivity]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, *32*(6), 340-343.
- Veras, T. N., Pizzichini, E., Steidle, L. J., Rocha, C. C., Moritz, P., & Pizzichini, M. M. (2011). Cellular composition of induced sputum in healthy adults. *J Bras Pneumol*, *37*(3), 348-353.
- Vignola, A. M., Riccobono, L., Mirabella, A., Profita, M., Chanez, P., Bellia, V., Mautino, G., D'Accardi, P., Bousquet, J., & Bonsignore, G. (1998). Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, *158*(6), 1945-1950. doi:10.1164/ajrccm.158.6.9803014
- Vocca, L., Di Sano, C., Uasuf, C. G., Sala, A., Riccobono, L., Gangemi, S., Albano, G. D., Bonanno, A., Gagliardo, R., & Profita, M. (2015). IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology*, *220*(8), 954-963. doi:10.1016/j.imbio.2015.02.005
- Wambre, E., DeLong, J. H., James, E. A., LaFond, R. E., Robinson, D., & Kwok, W. W. (2012). Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, *129*(2), 544-551, 551 e541-547. doi:10.1016/j.jaci.2011.08.034
- Wenzel, S., Wilbraham, D., Fuller, R., Getz, E. B., & Longphre, M. (2007). Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet*, *370*(9596), 1422-1431. doi:10.1016/S0140-6736(07)61600-6
- West, E. E., Kashyap, M., & Leonard, W. J. (2012). TSLP: A Key Regulator of Asthma Pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech*, *9*(3-4). doi:10.1016/j.ddmec.2012.09.003
- Woodruff, P. G., Boushey, H. A., Dolganov, G. M., Barker, C. S., Yang, Y. H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S. S., Dao-Pick, T. P., Pantoja, C., Erle, D. J., Yamamoto, K. R.,

- & Fahy, J. V. (2007). Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(40), 15858-15863. doi:10.1073/pnas.0707413104
- Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia, G., Abbas, A. R., Ellwanger, A., Koth, L. L., Arron, J. R., & Fahy, J. V. (2009). T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, *180*(5), 388-395. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC
- Wu, J., Wang, G., Hao, J., & Gong, W. (2014). The correlation between IL-20 and the Th2 immune response in human asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol*, *32*(4), 316-320. doi:110.12932/AP0447.32.4.2014
- Yagil, Z., Hadad Erlich, T., Ofir-Birin, Y., Tshori, S., Kay, G., Yekhtin, Z., Fisher, D. E., Cheng, C., Wong, W. S., Hartmann, K., Razin, E., & Nechushtan, H. (2012). Transcription factor E3, a major regulator of mast cell-mediated allergic response. *J Allergy Clin Immunol*, *129*(5), 1357-1366 e1355. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.051
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T. H., & Corrigan, C. (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*, *174*(12), 8183-8190.
- Yong, J., Chen, G. Q., Huang, B., & Wu, S. (2011). Correlation between the ratio of T-bet/GATA-3 and the levels of IL-4 and IFN-gamma in patients with allergic asthma. *Mol Med Rep*, *4*(4), 663-666. doi:10.3892/mmr.2011.469
- Yu, S., Kim, H. Y., Chang, Y. J., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2014). Innate lymphoid cells and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *133*(4), 943-950; quiz 951. doi:10.1016/j.jaci.2014.02.015
- Zhang, X. J., Zheng, G. G., Ma, X. T., Lin, Y. M., Song, Y. H., & Wu, K. F. (2005). Effects of various inducers on the expression of P2X7 receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Sheng Li Xue Bao*, *57*(2), 193-198.
- Zhou, B., Comeau, M. R., De Smedt, T., Liggitt, H. D., Dahl, M. E., Lewis, D. B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D. J., & Ziegler, S. F. (2005). Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol*, *6*(10), 1047-1053. doi:10.1038/ni1247
- Zhu, Y., Wang, W., & Wang, X. (2015). Roles of transcriptional factor 7 in production of inflammatory factors for lung diseases. *J Transl Med*, *13*, 273. doi:10.1186/s12967-015-0617-7
- Zissler, U. M. (2012). *Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum*. Veröffentlichte Dissertation.
- Zissler, U. M., Chaker, A. M., Effner, R., Ulrich, M., Guerth, F., Piontek, G., Dietz, K., Regn, M., Knapp, B., Theis, F. J., Heine, H., Suttner, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2016). Interleukin-4 and interferon-gamma orchestrate an epithelial polarization in the airways. *Mucosal Immunol*, *9*(4), 917-926. doi:10.1038/mi.2015.110

7 Anhang

7.1 Protokoll für Sputuminduktion



Arbeitsanweisung für Sputumgewinnung
bei Kindern und Jugendlichen

Seite 8 von 8
Stand: 24. März 2014
Zuletzt geändert von: U.Zissler

SPUTUM INDUZIERUNG				
PAT-ID _____	Beginn Induktion: _____ h			
Tag der Sputumgewinnung	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
	Tag	Monat	Jahr	
				Hat das Kind aktuell Anzeichen eines Schnupfens/ einer gewöhnlichen Erkältung? ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>
FEV ₁ -MESSUNGEN vor Sputuminduktion				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Höchster Wert
	FEV ₁ (L)	FEV ₁ (L)	FEV ₁ (L)	FEV ₁ (L)
Vor Broncholyse				
Salbutamol				
Nach Broncholyse				A
Berechnen Sie den Abfall des FEV ₁ um 10% bzw. 20% in Bezug auf den Höchsten Wert [FEV ₁ (L)] nach Verabreichung der 400 µg (4 Hübe) Salbutamol.				
Post-Bronchodilator FEV ₁ Abfall um 10 % (B)	<input type="text"/> L	B = A x 0.9		
Post-Bronchodilator FEV ₁ Abfall um 20 % (C)	<input type="text"/> L	C = A x 0.8		
SPUTUM INDUKTION und FEV ₁ -MESSUNGEN nach Sputuminduktion 1, 2 und 3				
	Konzentration NaCL	FEV ₁ in L	✓ bei Gabe von Salbutamol	Dosis an Salbutamol
Sputuminduktion 1				
Sputuminduktion 2				
Sputuminduktion 3				
Abschluss der Induktion: _____ h				

7.2 Mini-RQLQ

Patientennummer:

Datum:

Mini Rhinitis Quality of Life Questionnaire (deutsche Version)

Waren Sie <u>in der letzten Woche</u> aufgrund Ihrer aktuellen Beschwerden in den folgenden Tätigkeiten eingeschränkt?							
	Gar nicht	Kaum	Etwas	Mäßig	Ziemlich	Sehr	Extrem
Normale Tätigkeiten zu Hause und bei der Arbeit (berufliche Aufgaben und Aufgaben im und ums Haus und / oder im Garten, die Sie regelmäßig erledigen müssen)	0	1	2	3	4	5	6
Freizeitaktivitäten (Tätigkeiten mit Freunden und der Familie drinnen und draußen, Sport, Kontakte und Unternehmungen mit anderen Menschen, Hobbys)	0	1	2	3	4	5	6
Schlaf (Schwierigkeiten, richtig durchzuschlafen und/oder abends einzuschlafen)	0	1	2	3	4	5	6
Wie stark litten Sie <u>in der letzten Woche</u> aufgrund Ihrer aktuellen Beschwerden unter folgenden Problemen?							
	Gar nicht	Kaum	Etwas	Mäßig	Ziemlich	Sehr	Extrem
Nase oder Augen reiben zu müssen	0	1	2	3	4	5	6
Ständig die Nase putzen zu müssen	0	1	2	3	4	5	6
Niesen	0	1	2	3	4	5	6
Verstopfte Nase	0	1	2	3	4	5	6
Laufende Nase	0	1	2	3	4	5	6
Juckende Augen	0	1	2	3	4	5	6
Entzündete Augen	0	1	2	3	4	5	6
Tränende Augen	0	1	2	3	4	5	6
Müdigkeit und/oder Abgeschlagenheit	0	1	2	3	4	5	6
Durst	0	1	2	3	4	5	6
Reizbarkeit	0	1	2	3	4	5	6

7.3 PSQ

PSQ20 W4¹

Patientennummer:

Datum:

Im folgenden finden Sie eine Reihe von Feststellungen. Bitte lesen Sie jede durch und wählen Sie aus den vier Antworten diejenige aus, die angibt, wie häufig die Feststellung auf Ihr Leben **in den letzten 4 Wochen** zutrifft. Kreuzen Sie bitte bei jeder Feststellung das Feld unter der von Ihnen gewählten Antwort an. Es gibt keine richtigen oder falschen Antworten. Überlegen Sie bitte nicht lange und lassen Sie keine Frage aus.

		fast nie	manchmal	häufig	meistens
01. Sie fühlen sich ausgeruht.	PSQ01	1	2	3	4
02. Sie haben das Gefühl, dass zu viele Forderungen an Sie gestellt werden.	PSQ02	1	2	3	4
03. Sie haben zuviel zu tun.	PSQ04	1	2	3	4
04. Sie haben das Gefühl, Dinge zu tun, die Sie wirklich mögen.	PSQ07	1	2	3	4
05. Sie fürchten, Ihre Ziele nicht erreichen zu können.	PSQ09	1	2	3	4
06. Sie fühlen sich ruhig.	PSQ10	1	2	3	4
07. Sie fühlen sich frustriert.	PSQ12	1	2	3	4
08. Sie sind voller Energie.	PSQ13	1	2	3	4
09. Sie fühlen sich angespannt	PSQ14	1	2	3	4
10. Ihre Probleme scheinen sich aufzutürmen.	PSQ15	1	2	3	4
11. Sie fühlen sich gehetzt.	PSQ16	1	2	3	4
12. Sie fühlen sich sicher und geschützt.	PSQ17	1	2	3	4
13. Sie haben viele Sorgen.	PSQ18	1	2	3	4
14. Sie haben Spaß.	PSQ21	1	2	3	4
15. Sie haben Angst vor der Zukunft.	PSQ22	1	2	3	4
16. Sie sind leichten Herzens.	PSQ25	1	2	3	4
17. Sie fühlen sich mental erschöpft.	PSQ26	1	2	3	4
18. Sie haben Probleme, sich zu entspannen.	PSQ27	1	2	3	4
19. Sie haben genug Zeit für sich.	PSQ29	1	2	3	4
20. Sie fühlen sich unter Termindruck.	PSQ30	1	2	3	4

¹ Fliege, H., Rose, M., Arck, P., Levenstein, S. & Klapp, B. F. (2001). Validierung des "Perceived Stress Questionnaire" (PSQ) an einer deutschen Stichprobe. Diagnostica, 47, 142-152.

7.4 Kongressbeiträge

- Rothkirch S., Lewitan L., Dietz K., Gürth F., Schmidt-Weber C., Chaker A., Zissler U.M.: **Single cell analysis of lymphocyte subsets in induced sputum of grass-pollen allergic patients with asthma**, *Pittsburgh-Munich Lung Conference, Munich 10/2015*
- Zissler U.M., Rothkirch S., Lewitan L., Jakwerth C.A., Gürth F., Schmidt-Weber C.B., Chaker A.M.: **Influence of lower airways inflammation on regulatory T and B cell populations in grass-pollen allergic rhinitis and asthma patients**, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology Conference, Vienna 06/2016*
- Lewitan L., Rothkirch S., Jakwerth CA., Gürth F., Schmidt-Weber CB., Chaker AM., Zissler UM.: **Induced Sputum Transcriptome Reveals Biomarker Pattern in Patients with Allergic Rhinitis and Asthma**, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology Conference, Munich 05/2018*

8 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Schmidt-Weber bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. Bier danke ich für die Unterstützung.

Für die Betreuung während des gesamten Prozesses der Entstehung dieser Doktorarbeit gilt mein besonderer Dank zudem Herrn Dr. med. A. Chaker und Herrn Dr. phil. nat. U. Zissler, die meine Arbeit vom Anfang bis zum Abschluss begleitet haben.

Mein herzlicher Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe, insbesondere Sandra Rothkirch, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die gute und effektive Zusammenarbeit, die das Gelingen der Arbeit überhaupt erst ermöglichte.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums und darüber hinaus.