

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Klinische, morphologische und funktionelle Analyse leukozytärer Zellen bei allergischem Asthma bronchiale

Lynn Sophie zur Bonsen

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

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber
2. Priv.-Doz. Dr. Christina Schnopp

Die Dissertation wurde am 19.05.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2021 angenommen.

## **Zusammenfassung**

Makrophagen und Monozyten spielen eine entscheidende Rolle bei allergischen Entzündungsprozessen im respiratorischen Trakt. In dieser Studie werden die inflammatorischen und regulativen Eigenschaften dieser Zellen analysiert. Zudem werden die Vorteile einer erfolgreichen allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) bei Allergikern demonstriert. Die Expression von PD-L1 in Monozyten sowie der Neopterin-Spiegel im Sputum können als Biomarker für den Erfolg der AIT dienen. Weitere therapeutische Angriffspunkte stellen das Chemokin IP-10, die PD-Liganden sowie das Enzym IDO dar.

## **Abstract**

Macrophages and monocytes play a critical role during allergic inflammatory processes in the respiratory tract. In this study, the inflammatory and regulatory characteristics of these cells are analyzed. The benefits of a successful allergen-specific immunotherapy (AIT) for allergic patients are demonstrated. The expression of PD-L1 in monocytes as well as the level of Neopterin in sputum can be used as biomarkers for treatment success by AIT. Further therapeutic targets include the chemokine IP-10, the PD ligands and the enzyme IDO.

# Inhaltsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Einleitung.....   | 1  |
| 1.1   | Allergisches Asthma bronchiale und allergische Rhinitis ..... | 1  |
| 1.1.1 | Epidemiologie .....   | 1  |
| 1.1.2 | Ätiologie.....  | 1  |
| 1.1.3 | Definition, Symptome und Diagnostik.....                      | 2  |
| 1.1.4 | Pathophysiologie .....  | 3  |
| 1.1.5 | Therapie.....   | 4  |
| 1.2   | Mononukleäres-phagozytäres System.....                        | 6  |
| 1.2.1 | Monozyten.....  | 6  |
| 1.2.2 | Makrophagen.....  | 8  |
| 1.2.3 | Polarisierung der Makrophagen.....                            | 9  |
| 1.3   | Inter- und intrazelluläre Inflammation.....                   | 11 |
| 1.3.1 | PD-Liganden.....  | 11 |
| 1.3.2 | Neopterin .....   | 12 |
| 1.3.3 | Indolamin-2,3-Dioxygenase .....                               | 13 |
| 1.4   | Zielsetzung .....   | 14 |
| 2     | Material und Methoden .....                                   | 15 |
| 2.1   | Materialien.....  | 15 |
| 2.2   | Untersuchungskollektiv.....                                   | 19 |
| 2.3   | Untersuchungsablauf .....                                     | 20 |
| 2.4   | Allergologische Diagnostik .....                              | 21 |
| 2.5   | Blut- und Sputumentnahme .....                                | 21 |
| 2.6   | Labormethoden .....   | 22 |
| 2.6.1 | IgE-Antikörper Messung.....                                   | 22 |
| 2.6.2 | Blutaufarbeitung .....  | 23 |
| 2.6.3 | Sputumaufarbeitung .....                                      | 24 |
| 2.6.4 | Zytospinpräparate .....                                       | 26 |
| 2.6.5 | Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.....                 | 28 |
| 2.6.6 | FACS-Färbung und -Auswertung .....                            | 29 |
| 2.6.7 | Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest .....                   | 36 |
| 2.6.8 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....                 | 37 |
| 2.7   | Statistische Testverfahren .....                              | 38 |
| 3     | Ergebnisse.....   | 39 |
| 3.1   | Klinische Daten .....   | 39 |
| 3.1.1 | Untersuchungskollektiv .....                                  | 39 |
| 3.1.2 | Allergologische Diagnostik.....                               | 40 |
| 3.2   | Systemische Labordiagnostik.....                              | 44 |
| 3.2.1 | PBMC.....   | 44 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.2.2 | Serumüberstand .....                                       | 47  |
| 3.3   | Lokale Labordiagnostik.....                                | 50  |
| 3.3.1 | Sputum-Qualität .....                                      | 50  |
| 3.3.2 | Zytologie .....  | 53  |
| 3.3.3 | Durchflusszytometrie .....                                 | 53  |
| 3.3.4 | Sputumüberstand .....                                      | 57  |
| 3.4   | Vergleich der Ebenen .....                                 | 61  |
| 4     | Diskussion .....   | 63  |
| 4.1   | Ergebniseinordnung .....                                   | 63  |
| 4.1.1 | Allergologische Diagnostik.....                            | 63  |
| 4.1.2 | Systemische Ebene .....                                    | 65  |
| 4.1.3 | Lokale Ebene.....  | 69  |
| 4.1.4 | Vergleich der Ebenen.....                                  | 74  |
| 4.2   | Limitationen .....   | 76  |
| 4.2.1 | Untersuchungskollektiv .....                               | 76  |
| 4.2.2 | Labormethoden.....   | 77  |
| 4.3   | Bedeutung für die klinische Praxis .....                   | 79  |
| 5     | Zusammenfassung.....                                       | 81  |
| A     | Kongressbeiträge .....                                     | 83  |
| B     | Studienunterlagen.....                                     | 84  |
| B.1   | Standardarbeitsanweisung der Sputuminduktion .....         | 84  |
| B.2   | Fragebogen zum subjektiven Belastungsempfinden .....       | 88  |
| B.3   | Kleiner Rhinokonjunktivitis-Lebensqualitätsfragebogen..... | 89  |
|       | Literatur .....  | 90  |
|       | Danksagung.....  | 104 |

# Abbildungsverzeichnis

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1  | Medikamentöses Stufenschema bei Asthma bronchiale .....  | 4  |
| Abbildung 2  | Molekulare Mechanismen der AIT.....  | 6  |
| Abbildung 3  | Polarisierung der TH-Zellen .....  | 9  |
| Abbildung 4  | Polarisierung von Makrophagen .....  | 10 |
| Abbildung 5  | Neopterin-Stoffwechsel .....   | 12 |
| Abbildung 6  | Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs.....   | 19 |
| Abbildung 7  | Funktion des Vacutainer-Systems.....   | 23 |
| Abbildung 8  | Funktion der Neubauerkammer .....  | 24 |
| Abbildung 9  | Zytospinpräparate.....   | 27 |
| Abbildung 10 | Aufbau eines Durchflusszytometers .....  | 28 |
| Abbildung 11 | Kompensation der Emissionsspektren.....  | 29 |
| Abbildung 12 | Vergleich der Fluoreszenzsignale des PBMC-Panels.....  | 30 |
| Abbildung 13 | Vergleich der Fluoreszenzsignale des Sputum-Panels.....  | 31 |
| Abbildung 14 | Gating-Strategie der Monozyten .....   | 34 |
| Abbildung 15 | Gating-Prozess der Monozyten .....   | 34 |
| Abbildung 16 | Gating-Strategie der Makrophagen .....   | 35 |
| Abbildung 17 | Gating-Prozess der Makrophagen .....   | 36 |
| Abbildung 18 | Aufbau einer HPLC-Apparatur.....   | 37 |
| Abbildung 19 | Symbole zur Darstellung der Studiengruppen.....  | 39 |
| Abbildung 20 | Symptomangaben im mRQLQ-Fragebogen .....   | 40 |
| Abbildung 21 | Symptomangaben im mRQLQ-Fragebogen in der Allergiesaison.....                                  | 41 |
| Abbildung 22 | Vergleich des Belastungsempfindens .....   | 41 |
| Abbildung 23 | Vergleich des Asthmakontrolltests.....   | 42 |
| Abbildung 24 | Vergleich der Tiffeneau-Werte .....  | 42 |
| Abbildung 25 | Vergleich der IgE-Gesamtwerte .....  | 43 |
| Abbildung 26 | Vergleich der Gräserallergie-Klassen .....   | 43 |
| Abbildung 27 | Absolute Zellzählung der PBMC .....  | 44 |
| Abbildung 28 | Relative Zellzählung der PBMC .....  | 44 |
| Abbildung 29 | Vergleich der CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> -Monozyten der PBMC..... | 45 |
| Abbildung 30 | Vergleich der Expression von IFN- $\gamma$ und IL-10 in Monozyten .....                        | 45 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 31 Vergleich der Expression von IP-10 in Monozyten.....   | 46 |
| Abbildung 32 Vergleich der Expression von PD-L1 in Monozyten .....  | 46 |
| Abbildung 33 Vergleich der Expression von PD-L2 in Monozyten .....  | 47 |
| Abbildung 34 Vergleich der Neopterin-Spiegel im Serumüberstand .....  | 47 |
| Abbildung 35 IDO-Aktivität im Serumüberstand bei Immuntherapie .....  | 48 |
| Abbildung 36 IDO-Aktivität im Serumüberstand bei Rhinitikern und Asthmatikern.....  | 49 |
| Abbildung 37 Vergleich der Tryptophan- sowie Kynurenin-Spiegel im Serumüberstand ...  | 49 |
| Abbildung 38 Korrelation von IDO-Aktivität und Monozyten .....  | 50 |
| Abbildung 39 Vergleich der Gesamtleukozytenzahl.....  | 52 |
| Abbildung 40 Vergleich der Zelllast.....  | 52 |
| Abbildung 41 Absolute Zellzählung des Sputums .....   | 54 |
| Abbildung 42 Relative Zellzählung des Sputums .....   | 54 |
| Abbildung 43 Vergleich der CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> -Makrophagen im Sputum .....                   | 54 |
| Abbildung 44 Vergleich der Expression von IFN- $\gamma$ in Makrophagen.....   | 55 |
| Abbildung 45 Vergleich der Expression von IL-10 in Makrophagen .....  | 55 |
| Abbildung 46 Vergleich der Expression von IP-10 in Makrophagen.....   | 56 |
| Abbildung 47 Vergleich der Expression von PD-L1 in Makrophagen .....  | 56 |
| Abbildung 48 Vergleich der Expression von PD-L2 in Makrophagen .....  | 57 |
| Abbildung 49 Neopterin-Spiegel im Sputumüberstand bei Immuntherapie .....   | 57 |
| Abbildung 50 Neopterin-Spiegel im Sputumüberstand bei Rhinitikern und Asthmatikern .  | 58 |
| Abbildung 51 Neopterin-Spiegel im Sputumüberstand in der Allergiesaison.....  | 58 |
| Abbildung 52 Korrelation von Neopterin-Spiegel und CD16 <sup>-</sup> -Makrophagen .....   | 59 |
| Abbildung 53 Tryptophan-Spiegel im Sputumüberstand bei Immuntherapie .....  | 60 |
| Abbildung 54 Tryptophan-Spiegel im Sputumüberstand bei Rhinitikern und Asthmatikern   | 60 |
| Abbildung 55 Vergleich des Zytokinexpressionsmusters der CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> -<br>Zellen..... | 62 |
| Abbildung 56 Therapeutische Angriffspunkte .....  | 79 |

# Tabellenverzeichnis

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabelle 1  | Klassifikation der Monozyten.....   | 7  |
| Tabelle 2  | Verbrauchsmaterialien.....  | 15 |
| Tabelle 3  | Reagenzien .....  | 16 |
| Tabelle 4  | Antikörper.....   | 17 |
| Tabelle 5  | Geräte und Zubehör.....   | 18 |
| Tabelle 6  | Programme.....  | 18 |
| Tabelle 7  | CAP-Klassen .....   | 23 |
| Tabelle 8  | Statistische Testverfahren für den Vergleich zweier Gruppen.....  | 38 |
| Tabelle 9  | Kennzeichnung des Signifikanzniveaus in den Abbildungen .....   | 38 |
| Tabelle 10 | Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer .....   | 40 |
| Tabelle 11 | Vergleich der Sputum-Mikroskopie in der Allergiesaison .....  | 51 |
| Tabelle 12 | Vergleich der Sputum-Mikroskopie außerhalb der Allergiesaison .....   | 51 |
| Tabelle 13 | Vergleich der Sputum-Zytologie in der Allergiesaison .....  | 53 |
| Tabelle 14 | Vergleich der Sputum-Zytologie außerhalb der Allergiesaison .....   | 53 |
| Tabelle 15 | Vergleich des Zytokinexpressionsmusters der CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> -Zellen | 61 |

# Abkürzungsverzeichnis

## A

|   |  |
|---|--|
| AA - allergische Asthmatiker .....            |  |
| ACT - Asthmakontrolltest.....                 |  |
| AIT - allergenspezifische Immuntherapie ..... |  |
| AM - Alveolarmakrophagen.....                 |  |
| APC - Antigenpräsentierende Zellen.....       |  |
| AR - allergische Rhinitiker.....              |  |

## B

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| BMI - Körpermasseindex..... |  |
|-----------------------------|--|

## C

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| CD - Unterscheidungsgruppen..... |  |
|----------------------------------|--|

## E

|  |  |
|--|--|
| ELISA - enzymgekoppelter Immunadsorptionstest..... |  |
|--|--|

## F

|  |  |
|--|--|
| FACS - fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie..... |  |
| FCS - fetales Kälberserum.....                       |  |
| FEV1 - Einsekundenkapazität.....                     |  |
| FMO - Fluorescence Minus One.....                    |  |
| FSC - Vorwärtsstreulicht.....                        |  |
| FVS - fixierbarer Viabilitätsfarbstoff.....          |  |

## H

|   |  |
|---|--|
| HLA - humanes Leukozytenantigen .....                 |  |
| HPLC - Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ..... |  |

## I

|  |  |
|--|--|
| IDO - Indolamin-2,3-Dioxygenase.....         |  |
| IFN- $\gamma$ - Interferon- $\gamma$ .....   |  |
| IgE - Immunglobulin E.....                   |  |
| IL - Interleukin.....                        |  |
| IP - IFN- $\gamma$ induziertes Protein ..... |  |
| IS - innerhalb der Allergiesaison.....       |  |

## M

|  |  |
|--|--|
| MHC - Haupthistokompatibilitätskomplex.....                        |  |
| MPS - mononukleär-phagozytäres System .....                        |  |
| mRQLQ - kleiner Rhinokonjunktivitis-Lebensqualitätsfragebogen..... |  |



## **N**

NaCl - Natriumchlorid.....  
NaN<sub>3</sub> - Natriumazid .....  
NO - Stickstoffmonoxid.....

## **O**

OS - außerhalb der Allergiesaison.....  
OVA - Ovalbumin.....

## **P**

PBMC - mononukleäre Zellen des peripheren Blutes .....  
PBS - phosphatgepufferte Kochsalzlösung .....  
PD-L - Liganden des programmierten Zelltod-Rezeptors.....  
PSQ - Fragebogen zum subjektiven Belastungsempfinden .....  
p-Wert - Wahrscheinlichkeitswert.....

## **S**

SE - asymptomatisch sensibilisierte Teilnehmer .....  
SOP - Standardarbeitsanweisung.....  
SSC - Seitwärtsstreulicht.....

## **T**

TGF - transformierender Wachstumsfaktor.....  
TH-Zellen - T-Helferzellen.....

# 1. Einleitung

## 1.1. Allergisches Asthma bronchiale und allergische Rhinitis

Allergien stellen ein gesundheitliches und ökonomisches Problem von weltweitem Ausmaß dar. Eine Allergie ist eine schädliche Überempfindlichkeitsreaktion des Körpers auf Substanzen, die in natura harmlos sind (Murphy, Weaver & Janeway, 2018, S. 784). Zu den häufigsten Erkrankungen des allergischen Formenkreises zählen die allergische Rhinitis und das allergische Asthma bronchiale. Laut der World Allergy Organization leiden an diesen beiden Erkrankungen weltweit 400 respektive 300 Millionen Menschen. Alleine allergisches Asthma ist jährlich für 250 000 Todesfälle verantwortlich (Pawankar, Holgate, Canonica, Lockey & Blaiss, 2013, S. 36). Krankheitsfehltag und eine verminderte Produktivität verursachen zudem enorme wirtschaftliche Einbußen (Cardell et al., 2016; Zuberbier, Lötval, Simoens, Subramanian & Church, 2014).

### 1.1.1. Epidemiologie

Die Prävalenzen beider Erkrankungen variieren weltweit enorm, korrelieren jedoch positiv mit dem Bruttonationaleinkommen (Pawankar et al., 2013, S. 16). In Entwicklungsländern liegt die Asthma-Prävalenz teilweise unter 2 %, während in Industrienationen bis zu 15 % der Bevölkerung betroffen sind (Sinharoy, Mitra & Mondal, 2018). Allerdings zeigt die weltweite ISAAC-Studie vor allem in den einkommensschwächeren Ländern einen Anstieg der Prävalenzen (Asher et al., 2006; Björkstén, Clayton, Ellwood, Stewart & Strachan, 2008). Auch von der deutschen Bevölkerung sind 15 % an allergischer Rhinitis und 9 % an allergischem Asthma erkrankt (Langen, Schmitz & Steppuhn, 2013). Insbesondere um die Jahrtausendwende ist die Prävalenz stark angestiegen. Mittlerweile hat sich die Inzidenz jedoch auf hohem Niveau stabilisiert (Hermann-Kunz, 2000; Langen et al., 2013). Die Erkrankungen beginnen bereits im Kindesalter und erreichen die höchste Prävalenz in der Gruppe der 18- bis 39-Jährigen (Langen et al., 2013; Schlaud, Atzpodien & Thierfelder, 2007).

### 1.1.2. Ätiologie

Die Ursachen für die Zunahme allergischer Erkrankungen sind multidimensional. Ein Ansatz hängt grundlegend mit der Hygiene-Hypothese von Strachan (1989) zusammen. Er führt aus, dass Einzelkinder seltener betroffen sind und macht den unhygienischen Kontakt mit Geschwistern hierfür verantwortlich, da die resultierenden Infektionen die Entwicklung einer Allergie verhindern. Einen ähnlichen Ansatz verfolgen auch Mosmann und Coffman (1989), die T-Helferzellen (TH-Zellen) in zwei Typen unterteilen, wobei Typ 2-Zellen allergische Reaktionen verursachen. Sie zeigen, dass ausbleibende Infektionen die Aktivierung der Typ 1-Zellen verringern. Infolgedessen wird die Entwicklung der Typ 2-Zellen nicht gehemmt, was allergische Reaktionen befördert (Graham-Rowe, 2011). Mittlerweile konzentriert sich die Forschung auf das allgemeine mikrobielle Umfeld. Beispielsweise erkranken Kinder, die

auf einem Bauernhof aufwachsen, deutlich seltener, da beispielsweise ihre Matratzen reicher an mikrobiellen Strukturen und Endotoxinen sind (Braun-Fahrländer et al., 2002; von Mutius & Vercelli, 2010). Arrieta et al. (2015) zeigen diesen Zusammenhang auch anhand der Darmflora.

Neben dieser mikrobiellen Sichtweise spielen ebenfalls veränderte Umgebungsbedingungen eine wichtige Rolle. Wärmeisolierte Wohnungen mit erhöhter Luftfeuchtigkeit und Polstermöbeln erhöhen die Exposition gegenüber Hausstaubmilben und die Haltung von Haustieren führt zu einem vermehrten Kontakt mit Tierhaaren und -speichel (Calderón et al., 2015; Lau et al., 1989; Song et al., 2015; W. Wang et al., 2016). Außerdem verstärkt und verlängert der Klimawandel den Pollenflug und die Globalisierung führt zu einer vermehrten Aufnahme exotischer Nahrung (D'Amato et al., 2017; Eriksson et al., 2003). In urbanen Räumen belasten zudem Feinstaub und Stickoxide das Bronchialsystem (Clark et al., 2010).

Unabhängig von den veränderten Lebensbedingungen ist die genetische Veranlagung von besonderer Bedeutung. Leiden beide Eltern an allergischer Rhinitis, erhöht dies die Erkrankungswahrscheinlichkeit des Kindes um den Faktor 5,7 (Dold, Wjst, von Mutius, Reitmeir & Stiepel, 1992). Zudem tritt bei 40 % der an allergischer Rhinitis Erkrankten ein sogenannter Etagenwechsel auf. Diese entwickeln hiervon ausgehend zusätzlich allergisches Asthma. Über 80 % der Asthmatiker leiden ebenfalls an Rhinitis (Pawankar et al., 2013, S. 114; Brożek et al., 2017).

### **1.1.3. Definition, Symptome und Diagnostik**

Die allergische Rhinitis ist definiert als Inflammation der nasalen Schleimhaut, welche aus einer überempfindlichen Reaktion auf IgE-Antikörper nach Allergenexposition resultiert. Es wird zwischen einer intermittierenden und persistierenden Erkrankung unterschieden. Bei letzterer treten Symptomen an mehr als vier Tagen pro Woche über vier Wochen auf (Bachert et al., 2006; Klimek et al., 2019). Die Symptome einer allergischen Rhinitis sind Niesen, Juckreiz, verstärkter nasaler Fluss sowie Obstruktion. Außerdem tritt bei der Hälfte der Patienten <sup>1</sup> begleitend eine Konjunktivitis mit Rötung, Juckreiz und Tränen der Augen auf (Pawankar et al., 2013, S. 28; Brożek et al., 2017). Der klinische Verdacht wird durch den Pricktest, bei dem eine übermäßige Hautrötung und -schwellung bei Applikation des Allergens auftritt, sowie dem Nachweis von allergenspezifischen Immunglobulin E (IgE)-Antikörpern im Serum des Patienten bewiesen. Des Weiteren kann eine nasale Allergenprovokation oder eine Allergenkarenz zielführend für die Diagnose sein (Bachert et al., 2006).

Asthma bronchiale (kurz Asthma) ist als eine heterogene Erkrankung, welche durch eine chronische Entzündung der Atemwege gekennzeichnet ist, definiert (Global Initiative for Asthma, 2020). Asthma ruft Symptome wie Dyspnoe, Husten, Giemen und ein Gefühl der Enge in der Brust hervor. Diese treten episodenhaft und verstärkt nachts auf. Die Erkrankung wird

---

<sup>1</sup> Aus Gründen der Lesbarkeit wurde in der folgenden Arbeit die männliche Form gewählt, nichtsdestoweniger bezieht sie sich immer auf Personen beider Geschlechter.

in eine allergische sowie eine nicht-allergische Form eingeteilt. Die allergische Form ist ursächlich durch ein Einatmen von Allergenen gekennzeichnet. Bei der nicht-allergischen Form rufen Infekte der Atemwege, körperliche Belastung, Kälte, nichtsteroidale Antirheumatika, Acetylsalicylsäure, berufliche oder öffentliche Noxen einen Anfall hervorrufen. Im klinischen Alltag treten häufig Mischformen auf (Buhl et al., 2017; Bundesärztekammer, Bundesvereinigung & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2020). Neben dieser Einteilung kann eine Unterscheidung in verschiedene Cluster nach klinischen, demografischen oder pathophysiologischen Kriterien erfolgen. Insbesondere der zelluläre Phänotyp ist relevant für eine spezifische Therapie und wird daher in Abschnitt 1.1.5 näher erläutert (Global Initiative for Asthma, 2020). Im Zuge der klinischen Diagnostik können mitunter expiratorische trockene Rasselgeräusche wahrgenommen werden. Zudem zeigt die Lungenfunktionsdiagnostik eine reversible Obstruktion in der Spirometrie oder Ganzkörperplethysmographie (Buhl et al., 2017).

#### **1.1.4. Pathophysiologie**

Allergisches Asthma und die allergische Rhinitis werden im Sinne der vereinten Atemwege als eine Krankheit mit ähnlichem Pathomechanismus in unterschiedlicher Ausprägung in Nase und Lunge verstanden (Bousquet, Vignola & Demoly, 2003). Beide sind gemäß der Einteilung nach Coombs und Gell Typ-I-Allergien, also vom sogenannten Sofort-Typ. Bei Allergien dieses Typs führen Allergene über die Quervernetzung von IgE-Antikörpern zu einer Freisetzung von Histamin. Konkret bedeutet dies, dass der Körper auf harmlose Proteinstrukturen, die Allergene, mit einer verstärkten Aktivierung von Typ-2-TH-Zellen reagiert. Die daraufhin stimulierten B-Zellen produzieren spezifische Antikörper gegen das Allergen. Durch die Verknüpfung von zwei IgE-Antikörpern auf der Oberfläche von Mastzellen setzen diese Botenstoffe frei, die zu einer allergischen Reaktion führen. Das Molekül Histamin bewirkt eine sofortige Bronchokonstriktion und verstärkte Gefäßpermeabilität. Leukotriene, Prostaglandine und Zytokine bewirken eine länger anhaltende Inflammation und Konstriktion (Averbeck, Gebhardt, Emmrich, Treudler & Simon, 2007). Bei allergischem Asthma kommt es hierbei zu einer chronischen Entzündung der bronchialen Schleimhaut, vermehrter Bildung von bronchialem Sekret und einer Hyperreagibilität der Muskeln. Durch diese Mechanismen entsteht eine reversible Obstruktion der Atemwege, welche bei den Patienten einen Hustenreiz und Atemnot verursacht. Die bronchiale Hyperreaktivität kann im Verlauf auch Allergen-unabhängig zu Asthmaanfällen führen (Buhl et al., 2017).

Dieser komplexe Entzündungsvorgang ist jedoch noch nicht vollständig erforscht worden. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass weitere Immunzellen wie verschiedene Lymphozyten, Granulozyten und Zellen des mononukleären-phagozytären Systems eine Rolle spielen. Letzteres umfasst Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen und wird in Abschnitt 1.2 näher erklärt. Jüngere Ergebnisse zeigen zudem einen Einfluss von Epithelzellen und innatem lymphoiden Zellen (Lambrecht & Hammad, 2015; Lloyd & Hessel, 2010).

|                          | Stufe 1 | Stufe 2            | Stufe 3   | Stufe 4   | Stufe 5   |
|--------------------------|---------|--------------------|---|---|---|
| <b>Langzeit-therapie</b> |         | ICS niedrigdosiert | ICS niedrigdosiert + LABA (bevorzugt)<br><i>oder</i><br>ICS mitteldosiert                     | ICS mittel- bis hochdosiert + LABA (bevorzugt)<br><i>oder</i><br>ICS mittel- bis hochdosiert + LABA + LAMA* | ICS in Höchstdosis + LABA + LAMA*<br>und<br>Anti-IgE-<br><i>oder</i><br>Anti-IL-5-(R)-<br><i>oder</i><br>Anti-IL-4-R-Antikörper |
| <b>Bedarfs-therapie</b>  |         |                    | SABA<br><i>oder</i><br>ICS + Formoterol (zugelassen ab Stufe 3 bei gleicher Langzeittherapie) |   |   |

\*aus der Gruppe der LAMA ist Tiotropiumbromid zugelassen

**Abbildung 1** Medikamentöses Stufenschema bei Asthma bronchiale für Erwachsene. Basiert auf der nationalen S3-Versorgungsleitlinie Asthma (Bundesärztekammer, Bundesvereinigung & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2020). ICS = inhalative Kortikosteroide, SABA = kurzwirkende  $\beta$ -2-Sympathomimetika, LABA = langwirkende  $\beta$ -2-Sympatomimetika, LAMA = langwirkende Anticholinergika, R = Rezeptor

### 1.1.5. Therapie

Die allgemeine Therapie von allergischem Asthma erfolgt gemäß der nationalen S3-Versorgungsleitlinie Asthma (Bundesärztekammer et al., 2020). Primär ist die Allergenkarrenz neben Medikamenten sowie der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) eine grundlegende Säule der Behandlung allergischer Erkrankungen.

Die medikamentöse Therapie folgt einem 5-stufigen Prozess, welcher in Figure 1 zusammengefasst ist. Von Stufe 1 bis 4 erfolgt die Behandlung mittels einer Kombination von antiinflammatorischen inhalativen Kortikosteroiden (ICS) und bronchienerweiternden  $\beta$ -2-Sympathomimetika (SABA/ LABA). Bei schwerem Asthma können gegebenenfalls Leukotrienrezeptor-Antagonisten (LTRA) und anticholinergisches Tiotropium verabreicht werden. Auf Stufe 5 werden zusätzlich systemische Kortikosteroide oder Antikörper gegen IgE, Interleukin (IL)-5 oder den IL-4-Rezeptor in Erwägung gezogen.

Die medikamentöse Therapie der allergischen Rhinitis umfasst die Gabe nasaler Steroide und oraler Antihistaminika (Brožek et al., 2017). Diese Therapie adressiert gemäß dem Modell der vereinten Atemwege ebenfalls das allergische Asthma. Die Gabe nasaler Steroide verbessert die Lungenfunktion signifikant und vermindert das Auftreten von asthmatischen Symptomen. Außerdem verringert diese die Nutzung der Asthma-Bedarfsmedikation bei Patienten, die sowohl an allergischer Rhinitis als auch allergischem Asthma leiden (Lohia, Schlosser & Soler, 2013; Scadding, 2015).

Ergänzend zur symptomatischen Therapie des allergischen Asthmas und der allergischen Rhinitis wurde mit der AIT ein kausaler Ansatz zur Behandlung entwickelt (Klimek et al.,

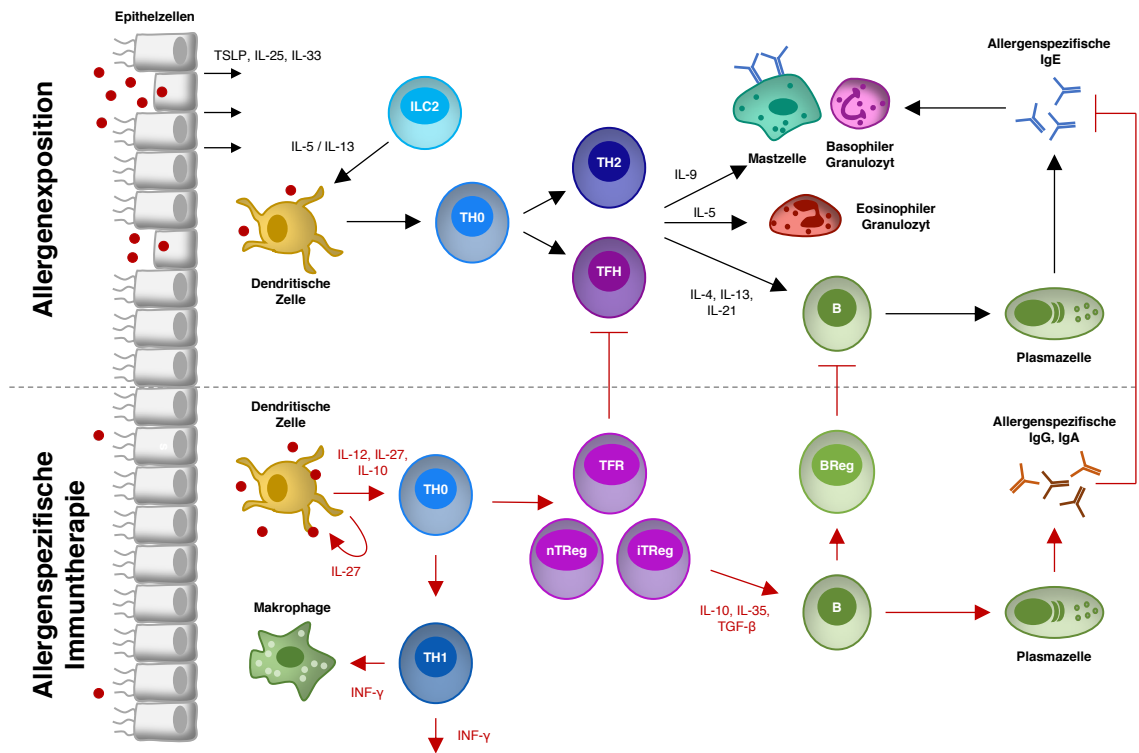
2019). Bei einer AIT wird dem Patienten in regelmäßigen Abständen eine hohe Dosis des für ihn relevanten Allergens verabreicht. Die Therapie erfolgt in der Regel über drei Jahre entweder täglich sublingual mit Tropfen oder Schmelztabletten oder monatlich subkutan mit Allergeninjektionen. Die Wirksamkeit der AIT ist für die Behandlung einer Pollen-, Hausstaubmilben-, Bienengift- und Wespengiftallergie in zahlreichen Studien gezeigt worden. Für die Tierhaar- oder Schimmelpilzallergie ist die Studienlage hingegen nicht eindeutig (Pfaar et al., 2014).

Die AIT verbessert die Lebensqualität der Patienten, da sowohl die Symptome der Rhinokonjunktivitis als auch Asthmaanfälle vermindert auftreten (Abramson, Puy & Weiner, 2010; Virchow et al., 2016; Walker, Pajno, Lima, Wilson & Durham, 2001). Bei Rhinitikern vermindert die AIT zudem die Gefahr eines Etagenwechsels hin zum Asthma (Jacobsen et al., 2007; Möller et al., 2002). Die Immuntherapie vermindert ferner das Auftreten neuer Sensibilisierungen gegen weitere Allergene (Marogna, Spadolini, Massolo, Canonica & Passalacqua, 2010).

Der Wirkmechanismus der AIT ist auf molekularer Ebene noch nicht vollständig erforscht. Die im Gegensatz zur natürlichen Exposition erhöhte Allergendosis führt zur Aktivierung von regulatorischen T- sowie B-Zellen. Regulatorische Zellen dienen der Induktion der körpereigenen Toleranz und verhindern auf diese Weise eine autoimmune Reaktion. Sie dämpfen das Immunsystem durch die Produktion von Zytokinen, wie IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- $\beta$ , wodurch die Aktivität der Typ-2-TH-Zellen reduziert wird und die IgE-durch eine IgG4- sowie IgA-Produktion abgelöst wird (Shamji und Durham, 2017; Murphy et al., 2018, S. 813; Zissler, Jakwerth et al., 2018). Abbildung 2 bietet einen Einblick in die komplexen Wirkmechanismen der AIT.

Der Einfluss von Zytokinen wurde bereits bei der Behandlung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gezeigt. Diese ist gemäß der S3-Leitlinie bei Stufe 5 für bestimmte Fälle bereits vorgesehen (Bundesärztekammer et al., 2020). Die Patienten erhalten beispielsweise Antikörper gegen das Zytokin IL-5, was zu einer verminderten Aktivierung eosinophiler Granulozyten und somit geringerer Effektivität der TH-Zellen Typ 2 führt (Castro et al., 2015; Ortega et al., 2014). 2019 wurde zusätzlich ein Medikament mit Antikörpern gegen IL-4 und IL-13 für die Therapie des schweren allergischen Asthmas zugelassen, welches ebenfalls in die Aktivierungskaskade der Lymphozyten eingreift (Wenzel et al., 2013).

Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen oder dendritische Zellen produzieren ebenfalls Zytokine. Das von ihnen produzierte IL-12 stimuliert die Differenzierung der TH-Zellen zu Zellen des Typs 1 (Shamji & Durham, 2017). Diese verstärkte Differenzierung führt zu einer erhöhten Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), welches die Bildung von IgE und Differenzierung der B-Zellen hemmt. Die IL-12 Ausschüttung bewirkt außerdem die Bildung von TGF- $\beta$  durch Monozyten und Makrophagen (Shamji und Durham, 2017; Murphy et al., 2018, S. 1077). Dieses kontrolliert die Proliferation und Differenzierung von TH-Zellen und vermindert auf diese Weise die allergische Reaktion.



**Abbildung 2** Molekulare Mechanismen der AIT. Adaptiert von Shamji und Durham (2017) sowie Pfaar et al. (2019). ILC = Innate lymphoide Zelle, TH = T-Helferzelle, TFH = folliculäre T-Helferzelle, nTReg = natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle, iTReg = induzierte regulatorische T-Zelle, BReg = regulatorische B-Zelle.

Diese Weiterentwicklung des Therapieansatzes von der symptomatischen zur kausalen Behandlung ist entscheidend zur Heilung der chronischen Erkrankung. Die bisher entwickelten Methoden sind jedoch sehr kosten- und im Falle der AIT auch zeitintensiv. Daher ist es wichtig, die Wirkweise und das Zusammenspiel der Immunzellen und deren Zytokine zu verstehen, um eine effektive und effiziente Behandlung sicherzustellen.

## 1.2. Mononukleäres-phagozytäres System

Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen bilden gemeinsam mit ihren Vorläuferzellen im Knochenmark das mononukleär-phagozytäre System (MPS). Dieses dient sowohl der primären Elimination von Pathogenen als auch der Organisation der Entzündungsreaktion (van Furth und Cohn, 1968; Murphy et al., 2018, S. 10). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt im Folgenden auf Monozyten und Makrophagen im Lungengewebe.

### 1.2.1. Monozyten

Etwa 2–8% der Leukozyten in der Blutzirkulation sind Monozyten (Dörner, 2013, S. 335). Bei einer Entzündung führt die chemotaktische Wirkung des Komplementsystems und der lokalen Immunzellen zu einer Anschwemmung von Monozyten. Diese setzen ihrerseits proinflammatorische Chemokine frei, um weitere Entzündungszellen anzuschwemmen (Ohura, Katona, Wahl, Chenoweth und Wahl, 1987; Murphy et al., 2018, S. 106 f.). Die anschließend

| Klassifikation             | CD16               | CD14               |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| klassische Monozyten       | CD16 <sup>-</sup>  | CD14 <sup>++</sup> |
| intermediäre Monozyten     | CD16 <sup>+</sup>  | CD14 <sup>++</sup> |
| nicht-klassische Monozyten | CD16 <sup>++</sup> | CD14 <sup>+</sup>  |

**Tabelle 1** Klassifikation der Monozytenpopulation anhand der Expression von CD16 und CD14. Basiert auf Ziegler-Heitbrock et al. (2010). + bedeutet 10-faches Expressionsniveau der Isotypkontrollen, ++ steht für eine 100-fach stärkere Expression als die Isotypkontrollen und – stellt keine Erhöhung dar.

von den Monozyten produzierten Zytokine dienen der Regulation der Aktivität von Lymphozyten und Förderung der Degranulierung von Granulozyten (Murphy et al., 2018, S. 138). Außerdem eliminieren Monozyten Erreger durch Phagozytose und die Bildung von Sauerstoffradikalen (Italiani & Boraschi, 2014). Ihre Verweildauer im Blut beträgt durchschnittlich 2-3 Tage, nachdem sie im Knochenmark gebildet wurden (Schmitz, 2011, S. 490). Nach der Einwanderung ins Gewebe entwickeln sie sich zu Makrophagen (Murphy et al., 2018, S. 98).

Monozyten können nach dem Nomenklatur-Komitee der Internationalen Union immunologischer Gesellschaften in drei Gruppen unterteilt werden: klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten. Für die Einteilung ist die Bildung von zwei Differenzierungsantigenen, Unterscheidungsgruppen (CD), entscheidend: CD14 und CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Table 1 zeigt die Klassifikation der Monozyten anhand der positiven oder negativen Expression von CD14 und CD16. Etwa 85–90 % der Monozyten sind klassische Monozyten und nur 5–10 % intermediäre oder nicht-klassische Monozyten (Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Die Rolle der verschiedenen Gruppen bei Entzündungsreaktionen und Infektionen ist vielfältig und Gegenstand zahlreicher Studien. Eine gute Übersicht findet sich in Wong et al. (2012). Klassische Monozyten besitzen das höchste Potential zur Phagozytose. Insbesondere intermediäre Monozyten präsentieren den TH-Zellen die im Rahmen der Phagozytose entstandenen Antigene über den humanen Leukozytenantigen (HLA)-Rezeptor. Diese Interaktion beeinflusst die Differenzierung der TH-Zellen und die Zytokinproduktion, wodurch ebenfalls die Aufrechterhaltung der allergischen Reaktion bestimmt wird (Zawada et al., 2011; Murphy et al., 2018, S. 786).

Die Verteilung der Monozytenpopulation wird durch inflammatorische Prozesse beeinflusst. Insbesondere die Population der intermediären Monozyten ist bei Patienten mit allergischem Asthma erhöht und ist positiv mit dem Symptom der bronchialen Hyperreagibilität korreliert (Kowal, Moniuszko, Dabrowska & Bodzenta-Lukaszyk, 2012). Eine Therapie mit Kortikosteroiden senkt den Anteil der intermediären und nicht-klassischen Monozyten und führt zu einer Erhöhung der klassischen Monozyten (Dayyani et al., 2003; Moniuszko, Bodzenta-Lukaszyk, Kowal, Lenczewska & Dabrowska, 2009). Eine ähnliche Entwicklung wird auch bei Patienten



mit atopischer Dermatitis beobachtet (Novak, Allam, Geiger & Bieber, 2002).

Nichtsdestotrotz ist die Rolle der verschiedenen Monozytengruppen während der Inflammation noch nicht vollständig erforscht. In dieser Arbeit wird der Einfluss der größten Population – der klassischen Monozyten – im Hinblick auf allergische Patienten untersucht.

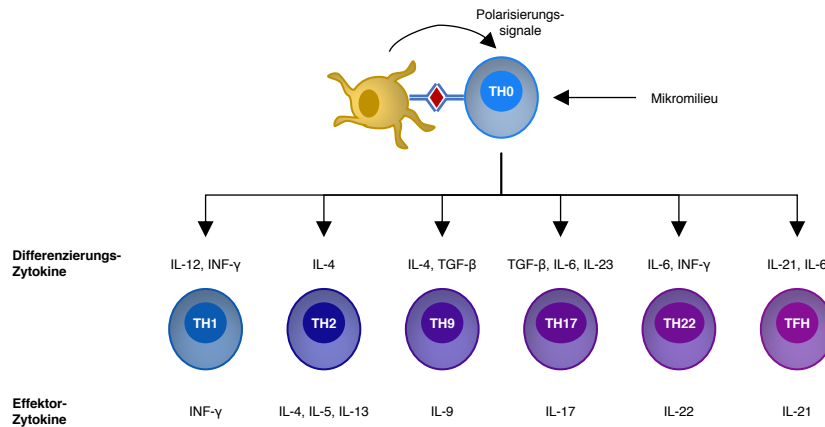
### **1.2.2. Makrophagen**

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems. Sie sind sowohl an der unspezifischen als auch an der spezifischen Immunantwort im Gewebe beteiligt. Zunächst nehmen sie mittels Phagozytose unspezifisch Erreger auf und bauen diese ab (Murphy et al., 2018, S. 9). Anschließend präsentieren sie Teile des Erregers TH-Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Komplex und leiten somit die spezifische Immunantwort ein (Murphy et al., 2018, S. 467).

Es wird zwischen ortsunabhängigen, mobilen Makrophagen und gewebeständigen Makrophagen (oder Gewebsmakrophagen) unterschieden. Mobile Makrophagen differenzieren sich aus Monozyten, die im Falle einer Entzündung rekrutiert werden und in das Gewebe einwandern (Murphy et al., 2018, S. 9). Gewebsmakrophagen bilden den größten Teil der Makrophagenpopulation und entstehen lokal durch die Mitose ihrer Vorgängerzellen. Die embryonalen Vorgängerzellen wandern pränatal in das jeweilige Organ ein (Hoeffel et al., 2015).

Im Lungengewebe wird zwischen Alveolarmakrophagen (AM), Atemwegsmakrophagen und interstitiellen Makrophagen unterschieden. AM und Atemwegsmakrophagen weisen hohe funktionelle und phänotypische Übereinstimmungen auf, weshalb sie in dieser Arbeit im Folgenden als AM zusammengefasst werden (Draijer & Peters-Golden, 2017). AM werden im Gewebe sowohl schützende als auch destruktive Faktoren zugeschrieben (Hussell & Bell, 2014). Auf der einen Seite produzieren gewebeständige AM Zytokine wie IL-10 und wirken somit antiinflammatorisch auf das umliegende Gewebe. Auf der anderen Seite können sowohl lokal proliferierende als auch zum Entzündungsherd rekrutierte AM die Inflammation auch verstärken (Draijer, Robbe, Boorsma, Hylkema & Melgert, 2013; Lee et al., 2015; Zaslona et al., 2014). Gewebs-AM von Patienten mit allergischem Asthma weisen eine geringere IL-10-Produktion auf (Draijer et al., 2017).

Makrophagen bilden eine der größten Zellpopulationen im respiratorischen Trakt und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Balance zwischen der Abwehr von Fremden und dem Schutz des Eigenen. Bisher ist unklar, unter welchen Bedingungen sie entzündungshemmend oder -verstärkend wirken. Ihre Untersuchung stellt daher einen unerlässlichen Schritt in der Erforschung der Pathophysiologie des allergischen Asthmas dar. Diese kann nicht-invasiv mittels Sputuminduktion erfolgen, um ein Abbild des lokalen Inflammationsgeschehens der Atemwege zu erhalten (Baines et al., 2014).



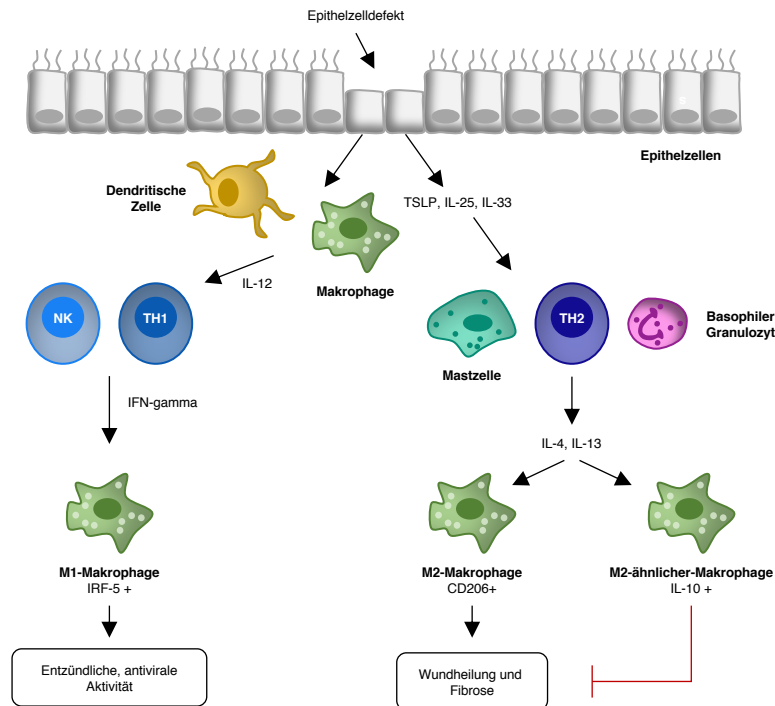
**Abbildung 3** Polarisierung der TH-Zellen. Adaptiert von Akdis, Palomares, van de Veen, van Splunter und Akdis (2012) sowie Saravia, Chapman und Chi (2019). TH = T-Helferzelle, TFH = folliculäre T-Helferzelle.

### 1.2.3. Polarisierung der Makrophagen

Wie zuvor beschrieben, haben Makrophagen sowohl protektive als auch inflammatorische Eigenschaften. Es wird vermutet, dass ihre Wirkung von einer Unterteilung in Subgruppen abgeleitet werden kann. Eine solche Unterteilung wurde bereits für  $CD4^+$ -TH-Zellen etabliert. Figure 3 enthält eine Übersicht über die verschiedenen inflammatorischen Wirkweisen der Subtypen.

Die TH1-Zelldifferenzierung dient der Abwehr von Bakterien und Viren, wohingegen TH2-Zellen für die Bekämpfung von Parasiten verantwortlich sind. Ferner wurden neben TH17-Zellen, welche ebenfalls extrazelluläre Pathogene bekämpfen, TH22- und TH9-Zellen nachgewiesen, die zu Entzündungen im Gewebe beitragen. Follikuläre TH-Zellen induzieren die Bildung von Antikörpern und sind vor allem im lymphatischen Gewebe anzutreffen. Im Gegensatz zu den inflammatorischen Zellen stehen die regulatorischen T-Zellen, welche entzündliche Prozesse supprimieren (Harrington et al., 2005; Murphy et al., 2018, S. 33, 479). Eine Hyperreaktion der jeweiligen Populationen hat jedoch auch negative Auswirkungen. So werden, wie zuvor erwähnt, TH2-Zellen als Hauptakteure in der Aufrechterhaltung der allergischen Inflammation angesehen (Murphy et al., 2018, S. 787). TH1 und TH17-Zellen werden im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen untersucht (Dardalhon, Korn, Kuchroo & Anderson, 2008).

Hiervon ausgehend wird aktuell untersucht, ob sich auch bei Monozyten und Makrophagen polarisierte Zellen gemäß dem Muster der TH-Zellen entwickeln (Murray et al., 2014; Stein, Keshav, Harris & Gordon, 1992). Eine solche Polarisierung lässt sich von der Bildung intrazellulärer Zytokine und extrazellulären Rezeptoren oder Liganden ableiten. Mills, Kincaid, Alt, Heilman und Hill (2000) haben zunächst eine M1-M2-Polarisierung von Makrophagen auf Basis der Differenzen im Stickstoffmonoxid (NO)- und Arginin-Metabolismus vorgeschlagen. Basierend auf dieser Arbeit und weiteren Studien beschreiben Mosser und Edwards (2008) hingegen drei Subpopulationen: klassisch aktiviert, wundheilend und regulatorisch. Andere Studien führen die wundheilenden Makrophagen als alternativ Aktivierte auf. Draijer et al.



**Abbildung 4** Polarisation von Makrophagen. Adaptiert von Murray und Wynn (2011). NK = Natürliche Killerzelle, TH = T-Helferzelle.

(2013) stellt fest, dass alternativ aktivierte und regulatorische Makrophagen eine phänotypische Ähnlichkeit aufweisen, weshalb sie auch als M2 und M2-ähnlich (M2-like) bezeichnet wurden. Beide unterscheiden sich durch ihre Zytokin-Expression und somit Wirkung, welche in Figure 4 aufgeführt ist. M1-Makrophagen entstehen durch eine Stimulation mit IFN- $\gamma$  oder TNF-alpha. Im Folgenden wird die M1-M2-Notation von Draijer et al. (2013) verwendet.

Es wird vermutet, dass die verschiedenen Populationen einen Einfluss auf die Entwicklung von allergischem Asthma haben. M2-Makrophagen konnten sowohl im Mausmodell bei Ovalbumin (OVA)-induziertem Asthma als auch bei Patienten mit allergischem Asthma verstärkt nachgewiesen werden (Melgert et al., 2011; Munitz, Brandt, Mingler, Finkelman & Rothenberg, 2008). In Biopsien von Lungengewebe von Asthmatikern wurde eine erhöhte Anzahl an M1- und M2-Makrophagen und eine geringere Anzahl an M2-ähnlichen Zellen gemessen (Draijer et al., 2017). Murray et al. (2014) schlagen eine Nomenklatur auf Basis der spezifischen Aktivierung und folgender Zytokinproduktion vor.

Auch bei Monozyten wird eine Polarisation vermutet. Veremeyko, Siddiqui, Sotnikov, Yung und Ponomarev (2013) vergleichen die microRNA von Monozyten und Makrophagen und stellen die Klassifikation der Monozyten anhand der CD14- und CD16-Expression in Zusammenhang mit der M1-M2-Unterteilung. Bei nicht-klassischen Monozyten wird eine M1-Polarisierung festgestellt und bei intermediären Monozyten eine M2-Polarisierung. Klassische Monozyten weisen hingegen Eigenschaften beider Gruppen auf.

Die aktuelle Forschungslage macht deutlich, dass eine dichotome Einteilung der Diversität von Makrophagen und Monozyten nicht gerecht wird. Zudem zeigen Studien, dass Zellen ihren Phänotyp ändern können und unterschiedlich auf Entzündungen reagieren (Naessens et al., 2012).

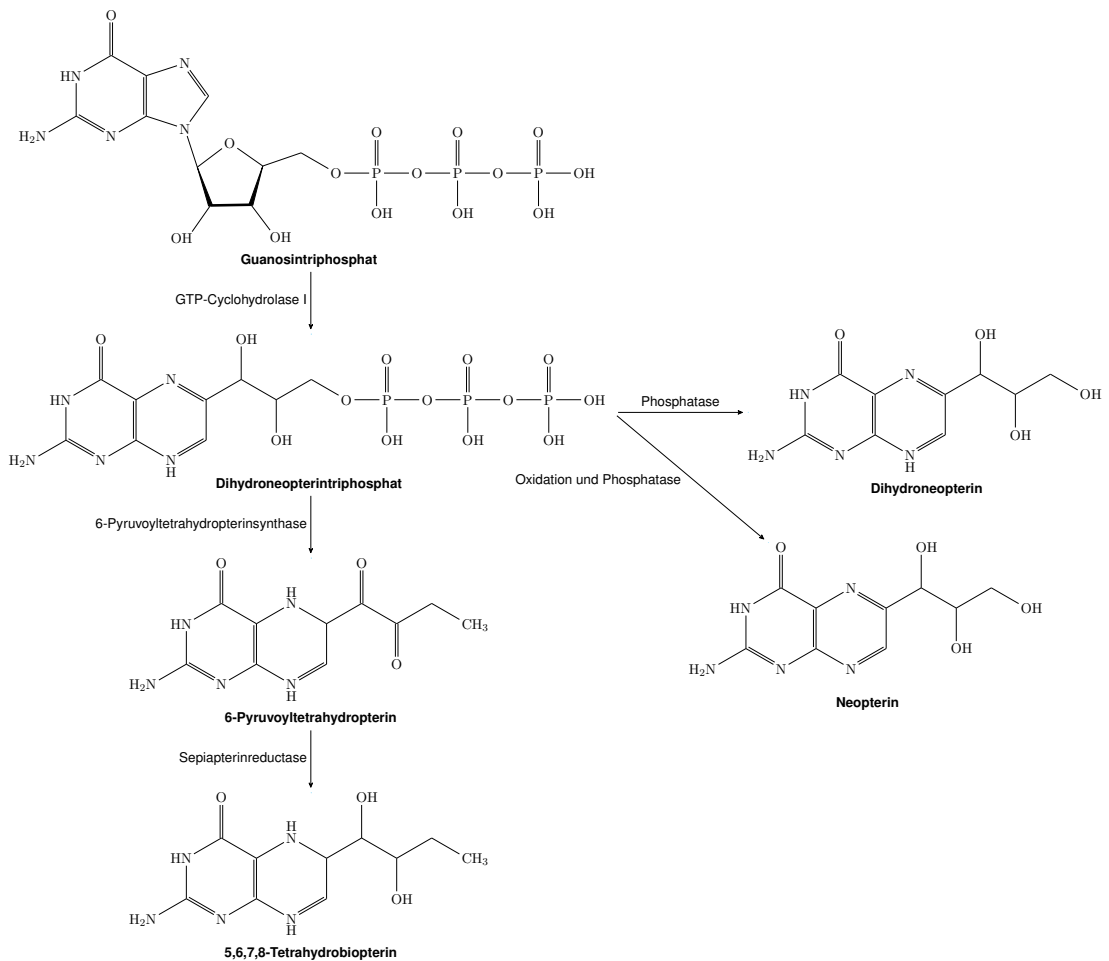
### 1.3. Inter- und intrazelluläre Inflammation

In einer Zelle laufen vielfältige Mechanismen ab, die Stoffwechselfvorgänge und Entzündungsprozesse organisieren. Auf der molekularen Ebene von Makrophagen und Monozyten existieren eine Vielzahl von Molekülen, die mit der Reaktion der Zelle auf eine Inflammation in Zusammenhang stehen. Diese zeigen entweder den Aktivitätszustand der Zelle an oder dienen der Kommunikation mit anderen Zellen. In dieser Arbeit werden unter anderem die Liganden des programmierten Zelltod-Rezeptors (PD-L), Neopterin und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) untersucht.

#### 1.3.1. PD-Liganden

PD-L sind Transmembranliganden, die bei Bindung an den programmierten Zelltod-Rezeptor-1 (PD-1) hemmend auf das Immunsystem wirken. PD-L1 wird auf der Oberfläche der meisten Immunzellen exprimiert. PD-L2 wird vor allem von APC gebildet (Murphy et al., 2018, S. 366). Die beiden Liganden binden an den PD-1 Rezeptor, welcher wiederum von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Die Liganden werden bei starken Entzündungssignalen vermehrt gebildet und hemmen über die Bindung an ihren Rezeptor die Signalübermittlung des T-Zell-Rezeptors (Murphy et al., 2018, S. 1148).

Diese Verbindung spielt bei verschiedenen Krankheitsbildern eine Rolle. PD-L1 wird beispielsweise auch von Tumorzellen exprimiert. Im Mausmodell können Antikörper gegen PD-L1 das Tumorwachstum vermindern, da die hemmende Wirkung der Tumorzellen auf die T-Zellen aufgehoben wird (Murphy et al., 2018, S. 946). Beim Menschen wird dieser Antikörper bereits erfolgreich in der Therapie des malignen Melanoms angewandt (Hamid et al., 2013). Auf der anderen Seite führt eine Hemmung des PD-1 Rezeptors zur Entwicklung einer autoimmunen Reaktion im Mausmodell (Murphy et al., 2018, S. 874). Auch beim Asthma ist eine Beeinflussung der T-Zell-Homöostase durch die Aktivität des PD-1 Rezeptors mit seinen Liganden nachgewiesen (Singh, Stock & Akbari, 2011). Die Verbindung von Rezeptor und Ligand wird als essenziell für die Beendigung einer akuten allergischen Reaktion beschrieben (Deppong et al., 2006).



**Abbildung 5** Neopterin-Stoffwechsel (Hoffmann, Wirleitner & Fuchs, 2003).

### 1.3.2. Neopterin

Das Molekül Neopterin ist ein Abbauprodukt des Immunsystems, das vermehrt unter oxidativem Zellstress bei einer Aktivierung des Immunsystems entsteht (Murr, Widner, Wirleitner & Fuchs, 2002). Neopterin wird vor allem in Makrophagen und Monozyten produziert. Seine biologische Funktion ist nicht vollständig geklärt. Neopterin verstärkt die Wirkung von Sauerstoffradikalen und erhöht somit möglicherweise das zytotoxische Potential der Makrophagen (Hoffmann, Wirleitner & Fuchs, 2003).

Die Bildung erfolgt aus Guanosin triphosphat durch die GTP-Cyclohydrolase I (Figure 5). Makrophagen und Monozyten bilden aufgrund eines Mangels an 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase vermehrt Neopterin und 7,8-Dihydroneopterin anstelle des Tetrahydrobiopterins (Werner et al., 1990). IFN- $\gamma$  ist der Hauptstimulator der Neopterinproduktion in Makrophagen (Huber et al., 1984). IFN- $\gamma$  wird durch aktivierte T-Zellen ausgeschüttet, weshalb der Neopterin-Spiegel als Indikator der Krankheitsaktivität angesehen werden kann.

Für eine Vielzahl von Erkrankungen spielt der Neopterin-Stoffwechsel eine wichtige Rolle in der Diagnostik, beispielsweise für HIV, KHK und maligne Tumore (Firoz et al., 2015; Fuchs et al., 2008; Melichar et al., 2017). Andere Studien zeigen eine Relevanz bei Autoimmun-

und entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis, Urtikaria und atopischer Dermatitis (Ciprandi et al., 2011; Sánchez-Regaña, M., 2000). Ein erhöhter Neopterin-Spiegel wurde auch bei Patienten mit allergischem Asthma gemessen (Licari, Fuchs, Marseglia & Ciprandi, 2019).

### **1.3.3. Indolamin-2,3-Dioxygenase**

Das Enzym IDO katalysiert den oxidativen Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Formylkynurenin. Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau von Tryptophan dar und reguliert hiermit die Immunantwort des Körpers (von Bubnoff & Bieber, 2012). IDO wird in verschiedenen APC wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen gebildet und durch IFN- $\gamma$  induziert (Munn & Mellor, 2013; Werner et al., 1987).

IDO beeinflusst über mehrere Mechanismen die Immunantwort. Das Edukt Tryptophan ist eine Aminosäure und somit essentiell für Protein-abhängige Stoffwechsel sowie zelluläre Signalwege. Eine Minderung der Aminosäure führt zu einer Aktivierung von Stressmechanismen bis hin zu einem Stillstand des Zellzyklus (Munn & Mellor, 2013). In der Folge kommt es zu einer verringerten Aktivierung von T-Zellen (Munn et al., 1999). Einen weiteren Mechanismus stellt die Wirkung des Abbauproduktes Kynurenin und dessen Metaboliten dar. Die Kynurenin-Metaboliten induzieren regulatorische T-Zellen durch eine Bindung am Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors und wirken folglich ebenfalls immunsuppressiv (Mezrich et al., 2010). Außerdem wird ihnen eine zytotoxische Wirkung auf T-Zellen zugeschrieben (Frumento et al., 2002). Ferner wirkt IDO selbst als Faktor in der intrazellulären Signalvermittlung. Für dendritische Zellen wurde gezeigt, dass IDO auf diese Weise zu einer langfristigen Stabilisierung des regulatorischen Phänotyps führt (Pallotta et al., 2011).

Die Relevanz von IDO für allergisches Asthma ist nicht vollständig geklärt (von Bubnoff & Bieber, 2012). Einige Studien sprechen für eine protektive Wirkung von IDO im Rahmen allergischer Erkrankungen: Maneechotesuwan, Supawita, Kasetinsombat, Wongkajornsilp und Barnes (2008) haben bei Asthmatikern eine herabgesetzte IDO-Aktivität im Sputum gemessen. Refaat, Abdel Rehim, El-Sayed, Mohamed und Khafagy (2015) konnten bei Patienten mit allergischer Rhinitis eine herabgesetzte IDO-Konzentration im Serum nachweisen. Glucocorticoide führen zu einem Anstieg der IDO-Aktivität (Grohmann et al., 2007). Im Mausmodell unterstützt die IDO-Aktivität die Wirkung der AIT (Taher et al., 2008).

## 1.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss von klassischen Monozyten auf systemischer Ebene und Makrophagen auf lokaler Ebene im Hinblick auf die Entwicklung und Behandlung von allergischer Rhinitis und allergischem Asthma bronchiale zu untersuchen. Zu diesem Zweck haben wir eine klinische Studie durchgeführt, deren Studienteilnehmer gemäß Ihrer Reaktion auf bestimmte Allergene unterteilt wurden. Der Fokus liegt hierbei auf der Gräserpollenallergie. Diese ist eine saisonale Allergie, weshalb die Studienteilnehmer jeweils innerhalb und außerhalb der Pollenflugzeit untersucht wurden. Die Unterteilung der Studienteilnehmer erfolgte basierend auf der allergischen Reaktion im Blut sowie Symptomen, welche einer allergischen Rhinitis oder einem allergischen Asthma bronchiale zugeordnet werden können. Zusätzlich wurde zwischen Studienteilnehmern mit und ohne abgeschlossener AIT unterschieden.

Bei den Studienteilnehmern wurden klinische Parameter und die Expression verschiedener Biomarker gemessen. In Blut und Sputum wurde das Niveau von Zytokinen (IFN- $\gamma$ , IL-10, IP-10) und Oberflächenproteinen (CD-16, HLA-DR, PD-L1, PD-L2) der Monozyten beziehungsweise Makrophagen bestimmt. Zusätzlich wurde der Spiegel der Moleküle Neopterin und IDO gemessen. Da die Zusammenhänge bisher unklar sind, erfolgt eine explorative Untersuchung von Unterschieden zwischen den Studienteilnehmergruppen. Hieraus können Rückschlüsse gezogen werden, wie Zellpolarisierung und Biomarker im Zusammenhang mit der Entstehung von Allergien und dem Etagenwechsel von allergischer Rhinitis zu allergischem Asthma bronchiale stehen. Zusätzlich können Erkenntnisse über die molekulare Wirkweise der AIT gewonnen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Materialien aufgeführt. Diese sind unterteilt in Verbrauchsmaterialien (Table 2), Reagenzien (Table 3), Antikörper (Table 4), Geräte und Zubehör (Table 5) sowie Programme (Table 6).

| Verwendung                     | Bezeichnung  | Hersteller               |
|--------------------------------|--|--------------------------|
| Blutentnahemadapter            | Multiple Sample Luer Adapter   | BD Vacutainer            |
| Einmal-Halter                  | 364815   | BD Vacutainer            |
| Salbutamol-Bronchodilatator    | Sultanol Dosier-Aerosol mit 200 Hub  | GlaxoSmithKline          |
| Deckglas                       | Menzel-Gläser 24 mm × 50 mm  | Thermo Fisher Scientific |
| Instrument-Desinfektionsmittel | Sekusept aktiv   | Ecolab Healthcare        |
| Einmalpipetten serologisch     | Cellstar 5 ml, 10 ml und 25 ml   | Greiner Bio-One          |
| Flügelkanüle                   | Safety-Multifly-Kanüle 21G   | Sarstedt                 |
| FACS Röhrchen                  | Röhre 5 ml, 75 mm × 13 mm  | PP Sarstedt              |
| Hautantiseptikum               | Octeniderm farblos   | Schülke                  |
| Immersionsöl                   | Type N   | Leica Microsystems       |
| Impföse                        | Inoculating loop blue  | VWR                      |
| Kulturplatte                   | TC Plate 96 Well Suspension  | R Sarstedt               |
| Kulturröhrchen                 | 12 mm × 75 mm Culture tubes  | VWR                      |
| Objektträger                   | Menzel-Gläser Superfrost Plus  | Thermo Fisher Scientific |
| Papierfilter                   | Filter Papers 90 mm  | Whatman                  |
| Pipettenspitzen                | Standard 10 µl, 200 µl und 1000 µl   | Eppendorf                |
| Pricktest-Lanzetten            | Prick-Lanzetten Mediprick  | Mediprick Allergy        |
| Pricktest-Lösungen             | 006 Gräser, 108 Birke, 309 Katzenepithelien, 708 Dermatophagoides farinae, 725 Dermatophagoides pteronyssinus, 901 Physiologische Kochsalzlösung, 902 Histamin 1+999 | Allergopharma            |
| PBMC-Vacutainer                | CPT Mononuclear Cell Preparation Tube, Sodium Heparin  | BD Vacutainer            |
| Reaktionsgefäße                | Reagiergefäß SafeSeal 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml   | Sarstedt                 |
| Reaktionsgefäß-Boxen           | EPPi Box 50 9 x 9 cells  | National Lab             |
| Schwangerschaftstest           | Hcg combo  | Hitado                   |
| Serumröhrchen                  | S-Monovette 7,5 ml   | Sarstedt                 |
| Spirometrie Filter             | KoKo Filter grau   | nSpire Health            |
| Transferpipette                | Transferpipette 3,5 ml   | Sarstedt                 |
| Zellkulturschale               | Fisherbrand Petri Dish   | Fisher Scientific        |
| Zellsieb                       | Cell Strainer 70 µm Nylon  | BD Falcon                |
| Zytospinfilterkarte            | Shandon Filter cards white   | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifugenröhrchen            | Cellstar polypropylen tubes 15 ml, 50 ml   | Greiner Bio-One          |

**Tabelle 2** Verbrauchsmaterialien



| <b>Produkt</b>   | <b>Hersteller</b>        |
|--|--------------------------|
| Acetonitril  | CCB Innsbruck            |
| Albumin 70 g/l   | CCB Innsbruck            |
| Ampuwa Sterilwasser  | Fresenius Kabi           |
| Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 1X (DPBS)                   | Gibco                    |
| eBioscience Intracellular Fixation + Permeabilization Buffer Set | Invitrogen               |
| Eukitt quick-hardening mounting medium                           | Fluka                    |
| FACSClean  | BD Biosciences           |
| FACSRinse  | BD Biosciences           |
| Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung                           | Merck                    |
| HyClone Fetal Bovine Serum Thermo Fisher                         | Scientific               |
| Kynurenin 1 mmol/l in bidestilliertem Wasser                     | CCB Innsbruck            |
| May-Grünwald-Lösung  | Merck                    |
| Methanol Rotipuran > 99,9 %                                      | Carl Roth                |
| Milli-Q Reinstwasser   | Merck                    |
| Natriumchloridlösung 3 %, 4 % und 5 % zur Inhalation             | Klinikum rechts der Isar |
| Natriumazid  | CCB Innsbruck            |
| 3-Nitro-L-Tyrosine 100 µmol/l                                    | CCB Innsbruck            |
| Potassium Phosphate Buffer 0,05 mol/l, pH 6                      | CCB Innsbruck            |
| Potassium Phosphate Buffer 0,015 mol/l, pH 6,4                   | CCB Innsbruck            |
| RNAprotect Cell Reagent  | Qiagen                   |
| Sputolysin (DTT in phosphate buffer, pH 6,5 - 7,5)               | Merck                    |
| Trichloroacetic acid 2 mol/l                                     | CCB Innsbruck            |
| Trypan Blue Stain 0,4 %  | Gibco                    |
| Tryptophan 1 mmol/l in bidistilled water                         | CCB Innsbruck            |
| Xylenes  | Sigma-Aldrich            |

**Tabelle 3** Reagenzien

| <b>Produkt</b>                         | <b>Hersteller</b> | <b>Produktnummer</b> |
|--|-------------------|----------------------|
| APC anti-human HLA-DR                  | BioLegend         | 307610               |
| APC/Cy7 anti-human CD45                | BioLegend         | 304014               |
| Brilliant Violet 650 anti-human CD273  | BD Biosciences    | 563844               |
| Brilliant Violet 711 anti-human CD274  | BioLegend         | 329722               |
| eFluor 660 anti-human IL-10            | eBioscience       | 50-7108-42           |
| Alexa fluor 488 anti-human CD16        | BioLegend         | 302019               |
| Human TruStain FcX                     | BioLegend         | 422302               |
| PE anti-human CXCL10                   | BioLegend         | 519504               |
| PE/Dazzle 594 anti-human IFN- $\gamma$ | BioLegend         | 502546               |
| Fixable Viability Stain 520            | BD Biosciences    | 564407               |
| Mouse IgG2a PE/Cy7                     | BioLegend         | 400253               |
| Mouse IgG1 APC-Cy7                     | BioLegend         | 400127               |
| Mouse IgG1 BV650                       | BioLegend         | 400163               |
| Mouse IgG2b BV711                      | BioLegend         | 400353               |
| Rat IgG1b eFluor 660                   | eBioscience       | 50-4031-82           |
| Mouse IgG1 FITC                        | BioLegend         | 400109               |
| Mouse IgG2a PE                         | BioLegend         | 400244               |
| Mouse IgG1 PE/Dazzle 594               | BD Biosciences    | 562292               |

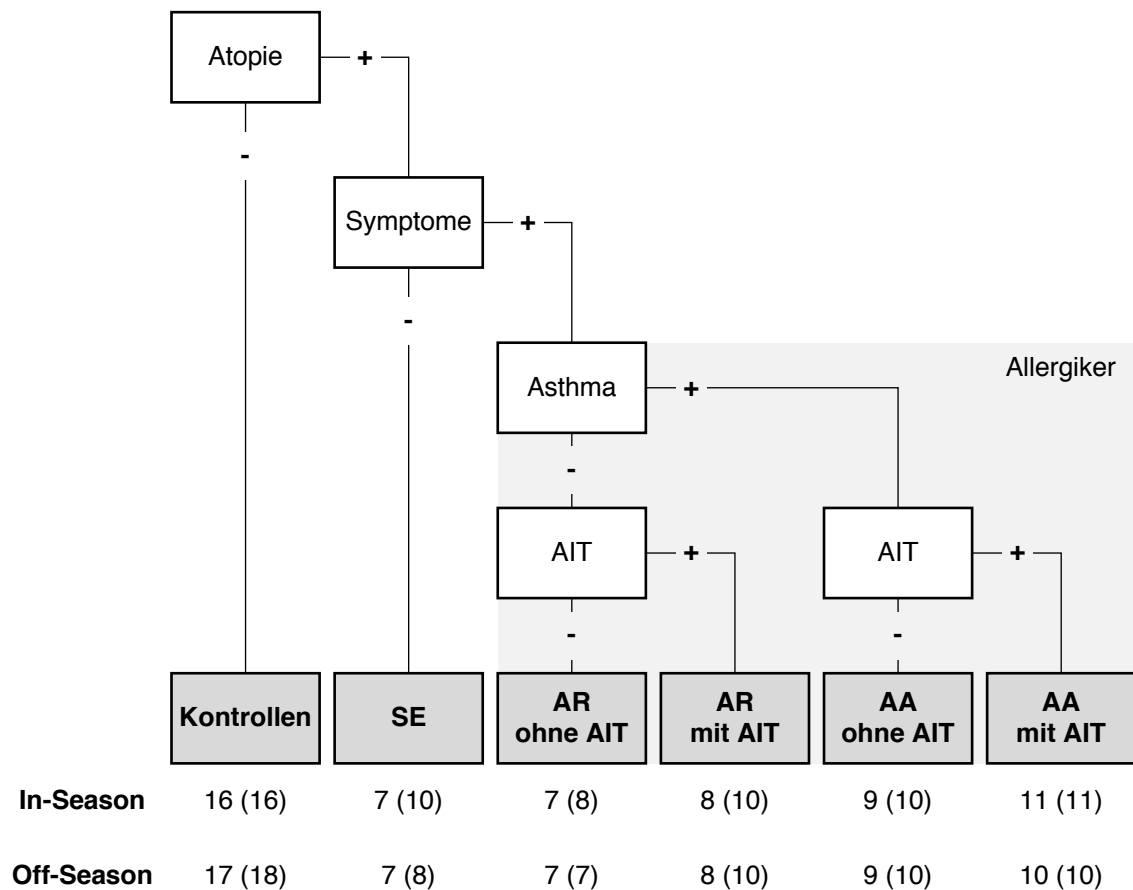
**Tabelle 4** Antikörper

| <b>Verwendung</b>             | <b>Bezeichnung</b>                                    | <b>Hersteller</b>        |
|-------------------------------|---|--------------------------|
| Blutdruckmessgerät            | Boso medicus control                                  | Bosch + Sohn             |
| Durchfusszytometriegerät      | LSRFortessa   | BD Biosciences           |
| Fluoreszenzdetektor           | ProStar 363   | Varian                   |
| Inhalationsgerät              | Pari TurboBOY SX                                      | PARI                     |
| Lichtmikroskop                | Axiovert 40C  | Zeiss                    |
| Lichtmikroskop                | Leica DMRB  | Leica Microsystems       |
| Pipetten                      | Pipette 0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl | Eppendorf                |
| Pipettierhilfe                | SwiftPET  | HTL                      |
| Röhrchenroller                | Digital tube roller SRT9D                             | Stuart                   |
| Spirometer                    | ZAN100 Spirometer mit Flowhandy ZAN100 USB            | nSpire Health            |
| Trennsäulen                   | Chromatographie LiChroCART RP18 columns               | Merck                    |
| UV-Detektor                   | SPD-6A UV-detector                                    | Shimadzu                 |
| Vibrationsmischer             | Vortex-Genie 2  | Scientific Industries    |
| Waage                         | Kern Analysenwaage ALJ                                | Kern und Sohn            |
| Zählkammer                    | Neubauer Improved 0,0025 mm <sup>2</sup>              | Marienfeld               |
| Zentrifuge                    | Megafuge 1.0R   | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifuge                    | Cytospin 4  | Thermo Fisher Scientific |
| Zentrifuge                    | Rotina 380R   | Hettich                  |
| Zentrifuge                    | EBA 20  | Hettich                  |
| Zytologie-Trichter            | Shandon TPX Single Sample Chamber                     | Thermo Fisher Scientific |
| Zytologie-Trichter-Verschluss | Shandon Cytoclip                                      | Thermo Fisher Scientific |

**Tabelle 5** Geräte und Zubehör

| <b>Programm</b>            | <b>Version</b> | <b>Hersteller</b>                   |
|----------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Excel                      | 16.15          | Microsoft Corporation               |
| FACS Diva Software         | 7.0            | Becton Dickensen                    |
| FlowJo                     | 10.2           | Becton Dickensen                    |
| GraphPadPrism              | 5.0f           | Graphpad Software                   |
| MacOS Mojave               | 10.14          | Apple                               |
| Windows                    | 10             | Microsoft Corporation               |
| Word                       | 16.14          | Microsoft Corporation               |
| ZAN-Tech Software (WinGPI) | 3.00           | nSpire Health                       |
| Zotero                     | 5.0            | Corporation for Digital Scholarship |

**Tabelle 6** Programme



**Abbildung 6** Aufteilung der Studienteilnehmer in die Untergruppen sowie deren Zusammensetzung in der IS und OS. Zudem ist die Anzahl der eingeschlossenen (untersuchten) Studienteilnehmer pro Untergruppe angegeben.

## 2.2. Untersuchungskollektiv

Die Studienteilnehmer wurden in sechs Gruppen unterteilt und jeweils einmal innerhalb und außerhalb des Gräserpollenfluges untersucht. Die Pollenflugsaison wird im Folgenden als innerhalb der Allergiesaison (IS) und die Untersuchung außerhalb des Pollenfluges als außerhalb der Allergiesaison (OS) bezeichnet. Der Gräserpollenflug wurde durch den Kalender der Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst erfasst (Werchan, Werchan & Bergmann, 2018). Die Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs verdeutlicht Figure 6.

Das Untersuchungskollektiv setzte sich in der IS aus 39 Gräserpollenallergikern, 16 gesunden Kontroll-Studienteilnehmern und acht Studienteilnehmern der Gruppe der asymptomatisch sensibilisierten Teilnehmern (SE) zusammen. Die Gruppe der SE gibt anamnestisch keine allergischen Symptome an. Jedoch zeigen die Studienteilnehmer eine positive Hautreaktion im Prick-Test sowie die Bildung von speziellen IgE-Antikörpern im Serum gegen bestimmte Allergene. Von den Gräserpollenallergikern waren 21 allergische Asthmatiker (AA), von denen elf eine AIT durchgeführt haben. Unter den 18 allergischen Rhinitikern (AR) haben zehn eine AIT durchgeführt. In der OS setzte sich das Untersuchungskollektiv aus 39 Gräserpollenallergikern, 16 Kontroll-Studienteilnehmern und acht Studienteilnehmern der Grup-

pe der SE zusammen. Figure 6 enthält eine Übersicht über die Anzahl der untersuchten und eingeschlossenen Studienteilnehmer in jeder Untergruppe.

Das Alter der Studienteilnehmer lag zwischen 18 und 65 Jahren. Zudem wurden verschiedene Ausschlusskriterien angewandt: Diese waren ex ante eine eingeschränkte Lungenfunktion trotz inhalativer Therapie (Einsekundenkapazität (FEV1) < 70%), eine schwere systemische internistische Erkrankung, eine systemische Immunsuppression, ein akuter Infekt und eine positive Raucher- oder Schwangerschaftsanamnese. Studienteilnehmer mit AIT haben diese mindestens über zwei Jahre konstant sublingual oder intrakutan angewandt und eine Verbesserung der allergischen Symptome hierdurch verspürt. Außerdem wurden ex post drei Studienteilnehmer nach der ersten Untersuchung während des Pollenfluges ausgeschlossen. Ein Studienteilnehmer der Gruppe der AR ohne AIT zeigte lediglich eine IgE-Antikörperreaktion gegen Birken- aber nicht gegen Gräserallergene. Zwei Studienteilnehmer der Gruppe der SE wiesen ebenfalls nur eine IgE-Antikörperreaktion gegen Milben- und Birkenallergene auf. Jeweils ein Studienteilnehmer der Gruppe der AA mit AIT sowie der Kontrollgruppe konnten nicht mehr zur OS-Untersuchung kommen. Jedoch wurden in der OS zwei neue Kontroll-Studienteilnehmer untersucht. Im Zuge der endgültigen Auswertung (nach IS und OS) wurden weitere vier Studienteilnehmer ex post ausgeschlossen. Ein Studienteilnehmer der Gruppe AR mit AIT führte die AIT nicht gegen die Gräser- sondern die Birkenallergie durch und ein weiterer Studienteilnehmer der Gruppe hatte die AIT nach einem Jahr abgebrochen. Ein Studienteilnehmer der Gruppe AA ohne AIT hatte vor vier Jahren die zusätzliche Milbenallergie mit einer AIT behandelt. Ein Studienteilnehmer der Gruppe der SE begann zum Zeitpunkt der Studie eine Therapie mit einem systemischen Immunsuppressivum. Die Sputumprobe eines Studienteilnehmers der Gruppe AR mit AIT wurde aus der Auswertung ausgeschlossen, da die Probe zu wenige Zellen für die Durchflusszytometrie-Messung enthielt.

Die Durchführung aller Untersuchungen erfolgte gemäß den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

### 2.3. Untersuchungsablauf

Die Untersuchung der Studienteilnehmer bestand aus einer allergologischen Diagnostik sowie der Blut- und Sputumentnahme. Zu Beginn führten Studienteilnehmerinnen außerdem einen Schwangerschaftstest per Urinprobe durch, um das Ausschlusskriterium der Schwangerschaft sicherzustellen. Der Blutdruck aller Studienteilnehmer wurde durch eine Oberarmmanschette gemessen und der Körpermassenindex (BMI) bestimmt.

## 2.4. Allergologische Diagnostik

Die Schwere und Auswirkungen der allergischen Erkrankung wurden anhand von drei Fragebögen ermittelt. Der standardisierte kleiner Rhinokonjunktivitis-Lebensqualitätsfragebogen (mRQLQ) diente der Erfassung der allergischen Symptombelastung des Untersuchungskollektivs. Hierbei wurden rhinitische, ophthalmologische und allgemeine Symptome wie Müdigkeit und Reizbarkeit und deren Alltagsrelevanz erfragt. Die Studienteilnehmer beantworteten die Fragen jeweils auf einer 7-stufigen Likert-Skala („gar nicht“ bis „extrem“; Juniper, Thompson, Ferrie und Roberts, 2000). Mit Hilfe des Fragebogen zum subjektiven Belastungsempfinden (PSQ) wurde das subjektive Belastungsempfinden anhand von 20 Fragen eingeschätzt. Die Bewertung erfolgte auf einer 4-stufigen Likert-Skala zwischen den Polen „fast nie“ und „meistens“ (Fliege, Rose, Arck, Levenstein & Klapp, 2001). Zur Objektivierung der Kontrolle des Asthmas wurde der Asthmakontrolltest (ACT) angewandt. Fünf Fragen wurden auf einer 5-stufigen Likert-Skala beantwortet. Die Summe der Antwortwerte führte zu einem Ergebnis zwischen fünf (nicht kontrolliert) und 25 (vollständig kontrolliert) Punkten (Schatz et al., 2006). Sämtliche Fragebögen sind im Anhang zu finden.

Zur Validierung der Allergieanamnese diente der Prick-Test am Unterarm. Das Untersuchungskollektiv wurde neben Gräserpollen (g6) auf Birkenpollen (rBetV1), Dermatophagoides pteronyssinus (nDerp1), Dermatophagoides farinae (nDerp2) und Katzenepithelien (e1) getestet. Jeweils ein Tropfen der bei 4 °C gekühlten Lösungen wurde auf den Unterarm gegeben. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten wurde die Flüssigkeit abgetupft und nach weiteren 15 Minuten das Ergebnis abgelesen. Positiv fiel das Ergebnis bei einer Schwellung und Rötung über 3 cm aus. Im Falle einer Hautreaktion wurde folgend der spezifische IgE-Titer des jeweiligen Antigens im Serum bestimmt. Die Höhe dieses Titers legt die CAP-Allergiekategorie fest. Als Positivkontrolle wurde Histamin und als Negativkontrolle Natriumchlorid (NaCl) verwendet. Zusätzliche Sensibilisierungen stellten kein Ausschlusskriterium dar, sofern Gräserpollen subjektiv als das Hauptallergen beschrieben wurden.

## 2.5. Blut- und Sputumentnahme

Den Studienteilnehmern wurde Blut und Sputum für die Untersuchung der Immunzellen entnommen. Für die Analyse der Zellen im Blut erfolgte eine venöse Blutentnahme. Die venöse Punktion wurde gemäß der Standardarbeitsanweisung (SOP) des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Mit Hilfe eines Butterfly-Systems wurden jeweils ein Serumröhrchen für die IgE-Messungen und zwei spezielle Vacutainer zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) abgenommen.

Neben den Immunzellen im Blut wurden ebenfalls Immunzellen der Atemwege analysiert. Als Material hierfür diente das Sputum der Studienteilnehmer (Zissler, Ulrich et al., 2018). Als Sputum wird das Sekret der unteren Atemwege bezeichnet, welches durch das Atem-

wegsepithel und submuköse Drüsenzellen exprimiert wird (Zissler, 2012, S. 5). Zu dessen Gewinnung erfolgte eine Sputuminduktion, die sich an Zissler (2012) orientierte. Vor Beginn der Induktion wurde die Lungenfunktion der Patienten bestimmt, welche Grundvoraussetzung für eine sichere Induktion ist. Mit Hilfe eines Spirometers wurden die forcierte Vitalkapazität (FVC) sowie die FEV1 ermittelt. Aus dem Quotienten von FEV1 und FVC wurde anschließend der Tiffeneau-Wert gebildet. Diese Parameter gelten als Indikatoren obstruktiver Lungenerkrankungen wie dem Asthma. Hierauf atmeten die Studienteilnehmer mit Hilfe eines Dosieraerosols 200 µg eines  $\beta$ -2-Sympathomimetikums zur Bronchienweiterung ein. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde dreimal die Lungenfunktion mit erweiterten Atemwegen bestimmt. Der höchste hierbei gemessene FEV1-Wert diente als Orientierung für die Kontrolle der Lungenfunktion während der Sputuminduktion (Post-Bronchodilatationswert).

Die Sputuminduktion bestand aus drei Inhalationsdurchgängen mit jeweils ansteigender Konzentration an Kochsalzlösung im Inhalat, nach welchen jeweils der Auswurf des Sputums erfolgte. Die Studienteilnehmer starteten mit der Inhalation einer 3-prozentigen sterilen hypertonen NaCl-Lösung für sieben Minuten. Diese wurde mit Hilfe eines Inhalationsgerätes durchgeführt. Der zweite Inhalationsvorgang erfolgte mit 4-prozentigen und der dritte Vorgang mit 5-prozentigen NaCl-Lösungen. Während der Inhalation stellte ein aufrechter Rumpf und eine Nasenklammer die suffiziente Atmung sicher. Zusätzlich wurde eine Atemführung mittels manueller Begleitung der Atmung und thorakaler Kompression während der Expirationsphase durchgeführt. Die Inhalation befeuchtet die Atemwege und der Salzgehalt der Flüssigkeit erzeugt einen Hustenreiz. Zur Reduktion der Epithelzellen im Sputum haben die Studienteilnehmer nach der Inhalation die Nase geputzt, den Mund gründlich mit Wasser ausgespült und die Stimmbildung vermieden. Durch kräftiges Husten wurde folgend das Sputum aus dem oberen Teil der Trachea abgelöst und in ein Plastikröhrchen ausgeworfen. Die Lungenfunktion wurde nach jeder Sputum-Produktion mittels Spirometrie kontrolliert. Bei einem Abfall der FEV1 auf unter 10 % im Vergleich zum Post-Bronchodilatationswert wurde die Messung nach zehn Minuten wiederholt. Bei erneutem Abfall auf > 10 % oder erstmaligem Abfall auf > 20 % wurde die Sputuminduktion sofort vorzeitig beendet und eine Notfallbehandlung mit Salbutamol eingeleitet. Die Sputumröhrchen wurden bei 4 °C transportiert und für maximal zwei Stunden gelagert. Das Protokoll der Sputuminduktion ist im Anhang zu finden.

## 2.6. Labormethoden

### 2.6.1. IgE-Antikörper Messung

Die Messung der Gesamt-IgE sowie speziellen Antikörper vom IgE-Typ im Blut diente der Quantifizierung der allergischen Reaktion des Körpers auf das spezifische Allergen. Ausgangsmaterial war das Serumblutröhrchen, welches 30 Minuten nach der venösen Punktion bei 6000 *rpm* für fünf Minuten zentrifugiert wurde, um das Serum von den zellulären Bestandteilen des Blutes zu trennen. Das daraufhin abpipettierte Serum wurde für maximal eine Woche bei 4 °C zwischengelagert. Die Messung der Proben erfolgte routinemäßig mit dem ImmunoCAP Antigen-ELISA (Thermo Fisher Scientific). Entsprechend des vorherigen

Pricktest-Ergebnisse wurde der spezifische IgE-Wert von Gräserpollen, Birkenpollen, Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae und Katzenepithelien bestimmt. Anhand des IgE-Wertes konnte die Allergie in eine so genannte CAP-Klasse eingeteilt werden (Table 7). Bei zehn Studienteilnehmern sind in der Klinik bereits vorhandene, maximal zwei Jahre alte IgE-Ergebnisse verwendet worden.

| CAP-Klasse              | 0             | 1             | 2             | 3             | 4             | 5            | 6    |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|------|
| Spezifische IgE [kUA/l] | 0,10–<br>0,35 | 0,35–<br>0,70 | 0,70–<br>3,50 | 3,50–<br>17,5 | 17,5–<br>50,0 | 50,0–<br>100 | >100 |

Table 7 CAP-Klassen

### 2.6.2. Blutaufarbeitung

Um die Immunzellen mit Hilfe von Antikörpern anzufärben und die Expression von Zytokinen zu messen, wurden diese aus den Blut- und Sputumproben isoliert. Die Immunzellen im Blut gehören zu den PBMC. Für die Aufarbeitung der PBMC wurden die Vacutainer direkt nach der venösen Punktion bei 3000 rpm für 20 Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Hierbei zeigte sich eine Trennung der Zellen des Vollblutes in zwei Phasen: eine basale Phase aus Erythrozyten und Granulozyten sowie eine apikale Phase aus mononukleären Zellen und Thrombozyten (Figure 7).

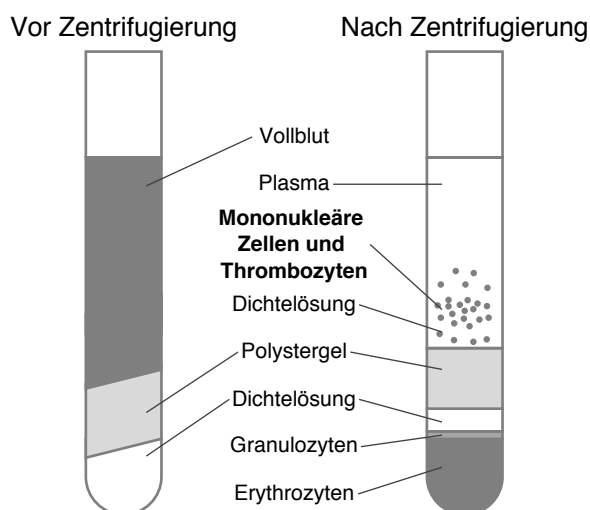
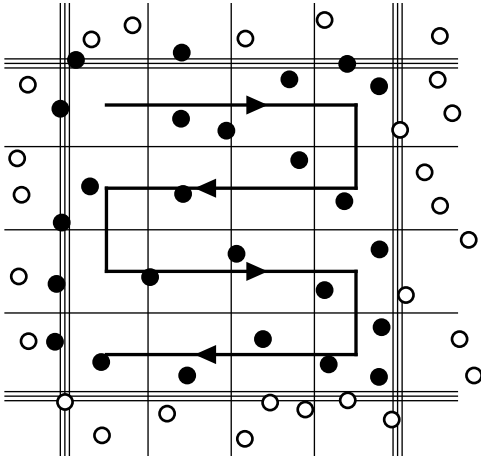


Abbildung 7 Verteilung der Blutzellen im Vacutainer abhängig von der Zentrifugierung. Basiert auf Becton, Dickinson and Company (2015).

Nach maximal 24 Stunden wurde der apikale Überstand durch eine vorsichtige 180°-Drehung durchmischt. Die Überstände jedes Studienteilnehmers sind jeweils in ein steriles 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt worden, welches dann bei 1200 rpm für zehn Minuten bei 20 °C zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation wurden vom diesem Serumüberstand pro Studienteilnehmer fünf Aliquots von 1000 µl in Kryoröhrchen überführt und unmittelbar bei –80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde hierbei nicht tangiert und der restliche Überstand verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte ein weiterer Waschvorgang, wozu das Zellpellet mit 1 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) vorsichtig gelöst wurde. Anschließend wurde das





**Abbildung 8** Mäanderförmige Zellzählung in der Neubauerkammer. Basierend auf Schmitz (2011).

Zentrifugenröhrchen auf 50 ml aufgefüllt und bei 1200 rpm für zehn Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Nach Abwurf des Überstandes wurde das Zellpellet erneut mit 1 ml PBS vorsichtig gelöst und mit PBS auf 10 ml verdünnt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der Probe in ein separates Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypanblau-Lösung 0,4 % überführt. Trypanblau dient der Färbung der Probe und ermöglicht die Differenzierung von toten Zellen, welche den Farbstoff verstärkt aufnehmen. Mittels Neubauerkammer erfolgte die Zellzählung der Suspension. Die mäanderförmige Zählweise ist in Figure 8 dargestellt. Die Anzahl Zellen pro Milliliter errechnen sich aus dem Ergebnis der Zählung, dem Verdünnungsfaktor 2/ml und dem Kammerfaktor 10 000 (Equation 1). Die Gesamtzellzahl der Suspension wird dann gemäß Equation 2 errechnet. Mit Hilfe der Zählkammer konnte die Zellzahl pro Milliliter sowie die Gesamtzellzahl der Suspension berechnet werden. Im Anschluss wurden die Proben auf  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml für die folgende Färbung der Zellsuspension für die Durchflusszytometrie-Analyse eingestellt. Hierfür nicht benötigte Zellen wurden mit 1 ml RNA-protect-Reagens resuspendiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = \frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{Anzahl Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \quad (1)$$

$$\text{Gesamtzellanzahl} = \text{Zellzahl pro Milliliter} \times \text{Volumen des Filtrats} \quad (2)$$

### 2.6.3. Sputumaufarbeitung

Die kontinuierlich auf Eis gelagerte Sputum-Probe wurde vor der Aufarbeitung gewogen und inspiziert. Das Probengewicht konnte durch das im Vorhinein bestimmte Gewicht des Gefäßes bestimmt werden (Equation 3). Durch die makroskopische Überprüfung wurde mittels einer Ordinalskala die Qualität des Sputums beurteilt, die in 4 Klassen angegeben wird: Mucoid, Muco-purulent, Purulent oder Fremdmaterial-Inhalt.

Ziel der folgenden Aufarbeitung des Sputums war, die Anzahl der Epithelzellen zu senken und die lebenden Sputumzellen aus der viskösen Matrix zu trennen (Zissler, 2012, S. 125; Pedersen et al., 2019). Plattenepithelzellen erschweren die Differenzierung der Sputumzellen bei der Biomarkeranalyse (Zissler, 2012, S. 123). Zu Beginn erfolgte die Überführung der gesamten Probe in eine Petrischale. Mittels einer Impföse und Eppendorf-Pipette wurde die zellreiche Komponente des Sputums ohne Saliva, welche einen erhöhten Anteil an Plattenepithelzellen enthält, extrahiert (Zissler, 2012, S. 125). Das Gewicht dieses selektierten Sputums wurde in einem neuen vorgewogenen 50 ml Zentrifugenröhrchen ermittelt.

Im Weiteren erfolgte die Lösung der Zellen von den hochviskösen Glykoproteinen des Sputums in drei Schritten. Zuerst wurde dem selektierten Sputum 1 : 10 in Aqua destillata verdünntes Sputolysin hinzugefügt. Sputolysin spaltet Disulfidbrücken, welche die zentralen Verbindungen im Glykoproteinnetz darstellen (Zissler, 2012, S.125). Die Menge des addierten Sputulysins in Milliliter betrug das Vierfache der Menge an selektiertem Sputum in Gramm. Zur Ablösung der Zellen vom mucösen Glykoproteinnetz wurden die Zellverbände vorsichtig mit einer Pipette aspiriert. Neben der chemischen Spaltung erfolgte die Lösung der Zellen im zweiten Schritt mechanisch durch Schüttelbewegungen. Das Zentrifugenröhrchen wurde zunächst für 15 Sekunden gevortext und anschließend für 15 Minuten auf einem Schüttelgerät bei 4 °C gemischt. Anschließend wurde die Probe mit der zweifachen Menge des Gewichtes (Gramm) in PBS (Milliliter) verdünnt und für 15 Sekunden gevortext. Bei hoher Viskosität erfolgte eine erneute Mischung für fünf Minuten auf dem Schüttelgerät bei 4 °C. Im dritten Schritt wurde die Probe über einen mit PBS befeuchteten 70 µm Filter in ein neues vorgewogenes 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Das neue Gewicht der Sputum-Probe wurde ermittelt.

Um die Anzahl der Sputumzellen zu bestimmen, wurden 10 µl der gewonnenen Probe mit 10 µl Trypanblau-Lösung 0,4 % in einem separaten Reaktionsgefäß gemischt. Innerhalb von fünf Minuten wurde die mäanderförmige Zellzählung mittels Neubauerkammer durchgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch einen Viskositätsverlust zu vermeiden. In den vier Quadranten der Zählkammer wurde jeweils die Anzahl an lebenden Leukozyten, toten Leukozyten und squamösen Zellen (Plattenepithelzellen) bestimmt und ein Durchschnittswert sowie prozentualer Anteil ermittelt. Pro Quadranten wurden 100 Zellen gezählt. Falls mehr als 200 Zellen pro Quadranten zählbar gewesen wären, wurde die Gesamtprobe mit PBS weiter verdünnt, da eine zu hohe Zelldichte die Qualität der Zählung mindert.

Zuletzt erfolgte die Kryokonservierung der Sputumüberstände und die Einstellung der Probe auf eine bestimmte Zellzahl. Hierfür wurde die Gesamtprobe für zehn Minuten bei 2000 rpm bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert, um einen möglichst zellfreien Überstand zu generieren. Pro Studienteilnehmer wurden jeweils fünf Aliquots des Sputumüberstandes von idealerweise 1000 µl in Kryoröhrchen gegeben, wobei bei weniger Material jedes Kryoröhrchen mindestens 200 µl enthielt, und umgehend bei –80 °C gelagert. Der Gesamtwert an Leukozyten in der Probe wurde berechnet und das Resuspensionsvolumen für eine Konzentration von

$0,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml bestimmt, welche für die Anfertigung der Zytospinpräparate notwendig war. Die Formeln für die Berechnungen sind in Equation 4, 5 und 6 zu finden. Das Zellpellet wurde zunächst mit 1 ml PBS gelöst und anschließend mit dem restlichen Volumen aufgefüllt. Nach Anfertigung der Zytospinpräparate wurde die Probe auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml für die Färbung der Zellsuspension für die Durchflusszytometrie-Analyse eingestellt. Hierfür nicht benötigte Zellen wurden mit 1 ml RNA-protect-Reagens resuspendiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

$$\text{Gewicht Sputum} = \text{Gewicht gefülltes Gefäß} - \text{Gewicht leeres Gefäß} \quad (3)$$

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = \frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{Anzahl Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \quad (4)$$

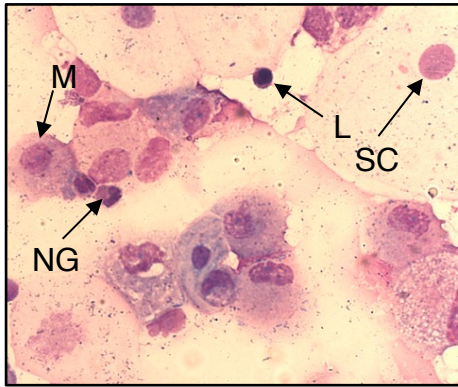
$$\text{Gesamtzellanzahl} = \text{Zellzahl pro Milliliter} \times \text{Volumen des Filtrats} \quad (5)$$

$$\text{Resuspensionsvolumen} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{0,5 \times 10^6 / \text{ml}} \quad (6)$$

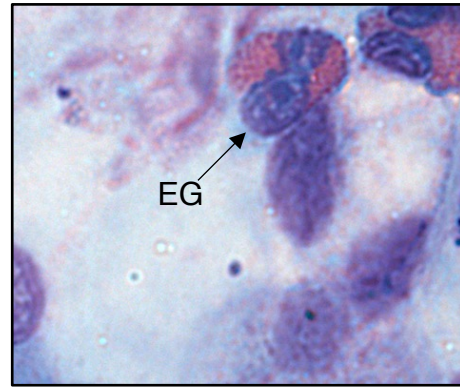
#### 2.6.4. Zytospinpräparate

Die Zytodiagnostik diente der mikroskopischen Untersuchung gefärbter Zellen. Für die Zytodiagnostik des Sputums wurden pro Studienteilnehmer vier Zytospinpräparate angefertigt. Mit Hilfe der Zytospin-Trichter können Objektträger mit einer dünnen Zellschicht angefertigt werden, die die Voraussetzung einer genauen Beurteilung der Zellen darstellt. In jeweils zwei Zytospin-Trichter wurden  $75 \mu\text{l}$  beziehungsweise  $100 \mu\text{l}$  der Zellsuspension von  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml pipettiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen konnte die Gewinnung einer optimalen Zelldichte für die Zytodiagnostik sichergestellt werden, welche je nach Probe variierte. Nach der Befüllung der Zytospin-Trichter erfolgte die Zentrifugation für sechs Minuten bei 450 rpm. Hierauf wurden die am Trichter fixierten Objektträger abgenommen, für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für zehn Minuten in Methanol fixiert. Nach weiteren 30 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur wurde die Zelldichte auf den Objektträgern mikroskopisch beurteilt. Bei einer zu großen Zelldichte ist die Gesamtprobe verdünnt und die Zytospinpräparate erneut angefertigt worden.

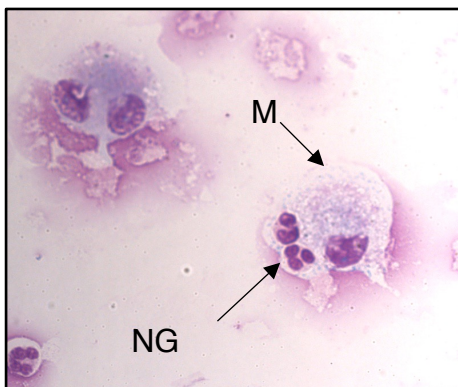
Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung der Objektträger. Zur Beurteilung der Zellen wurde die Färbung nach Pappenheim genutzt. Hierfür sind die Objektträger nacheinander in zwei verschiedene Lösungen gegeben worden: May-Grünwald und Giemsa. 20 ml der Giemsa-Lösung wurden im ersten Schritt mit 80 ml Aqua destillata verdünnt. Hierauf wurden diese 100 ml sowie 100 ml der May-Grünwald-Lösung durch ein Filterpapier in jeweils eine Wanne überführt. Im nächsten Schritt sind die Objektträger zuerst acht Minuten in der May-Grünwald-Lösung gefärbt und anschließend mit Leitungswasser abgewaschen worden. Im Anschluss



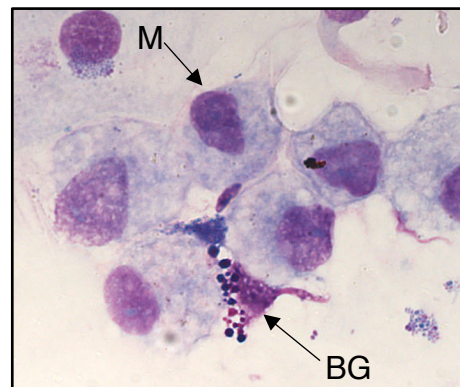
(a) Fotografie des Zytospinpräparates einer Sputumprobe: L=Lymphozyt, M=Makrophage, NG=Neutrophiler Granulozyt, SC= Squamöse Zelle



(b) Fotografie des Zytospinpräparates einer Sputumprobe: EG=Eosinophiler Granulozyt



(c) Fotografie des Zytospinpräparates einer Sputumprobe: M=Makrophage, NG=Neutrophiler Granulozyt

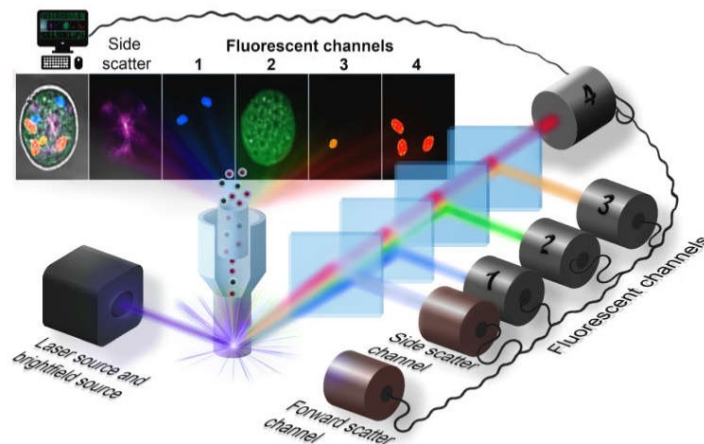


(d) Fotografie des Zytospinpräparates einer Sputumprobe: M=Makrophage, BG=Basophiler Granulozyt.

**Abbildung 9** Zytospinpräparate

erfolgte die Färbung der Objektträger über 35 Minuten in der Giemsa-Lösung. Hiernach wurden diese erneut mit Leitungswasser abgewaschen und zum Trocknen ausgelegt. Die Wannen wurden nach der Färbung mit Aceton ausgewaschen.

Die trockenen Objektträger wurden zum Schutz des Zellpellets mit einem transparenten Glas bedeckt. Hierfür sind die Objektträger für zehn Sekunden in Xylol getaucht und anschließend mit drei Tropfen des Eindeckmediums Eukitt mit Abstand zum Zellpellet benetzt worden. Das Deckglas wurde luftblasenfrei auf dem Träger platziert. Die Zellzählung erfolgte mittels Lichtmikroskopie. Das Zellpellet wurde in vier Quadranten unterteilt, in welchen jeweils 400 Zellen lichtmikroskopisch differenziert wurden. Anschließend erfolgte die Berechnung eines Durchschnittswertes für die Anzahl an Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und Epithelzellen. Figure 9a, 9b, 9c und 9d zeigen Fotografien der einzelnen Zellen in der Zytospin-Mikroskopie.



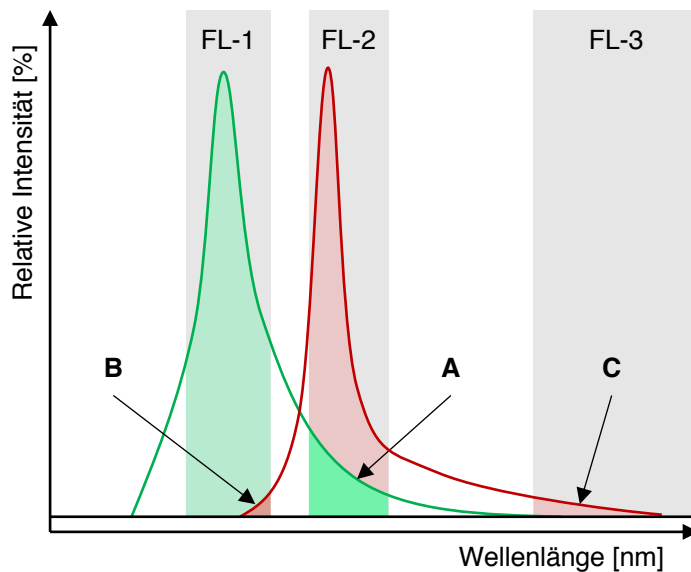
**Abbildung 10** Aufbau eines Durchflusszytometers zur fluoreszenzbasierten Zellanalyse.

### 2.6.5. Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Bei der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie (FACS) werden Zellen mittels Laserlicht analysiert. Durch hydrodynamische Kräfte wird ein Flüssigkeitsstrom von hauptsächlich einzelnen Zellen erzeugt. Die Zellen fließen an einem Laser vorbei und erzeugen eine Streuung dessen Lichtes. Ein Detektor gegenüber dem Laser erfasst das Vorwärtsstreulicht (FSC), das proportional zur Größe der einzelnen Zelle ist. Ein um  $90^\circ$  versetzter Detektor erfasst das Seitwärtsstreulicht (SSC), das durch die interne Komplexität, wie der Granularität der Zellen, bestimmt wird. Die Detektoren wandeln die Lichtenergie des Lasers in Spannungspulse um. Die Daten der Detektoren werden durch den Computer in ein digitales Format umgewandelt (Murphy et al., 2018, S.1002, 1003). Figure 10 zeigt den schematischen Aufbau eines FACS-Gerätes, wobei das in dieser Studie verwendete Gerät keine Mikroskop-Funktion aufwies.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit Hilfe von Optiken und Detektoren durchgeführt. Fluoreszenz beschreibt die Fähigkeit eines Moleküls durch die Absorption einer bestimmten Energiemenge in einen Erregungszustand überzugehen und beim Verlassen dieses Zustandes Licht einer spezifischen Wellenlänge zu emittieren (Fritsche, 2013, S.99-102). Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, die jeweils auf eine unterschiedliche Laserenergie ansprechen und infolgedessen verschiedenfarbiges Licht emittieren. Je nach Wellenlänge durchtrat das freigesetzte Licht die hintereinandergeschalteten Spiegel oder wurde zu seinem spezifischen Detektor abgelenkt. Auf diese Weise konnten die verschiedenen Antikörper unabhängig und auch gleichzeitig pro Zelle detektiert werden.

Zur Sicherstellung der Validität der Auswertungen wurden verschiedene Kontrollmechanismen angewandt. Für eine klare Differenzierung der einzelnen Farben wurden Filter um die Peaks der emittierten Wellenlängen gelegt. Überschneidungen der Wellenlängen innerhalb der Filterbereiche benachbarter Farbstoffe wurden mittels elektronischer Kompensation subtrahiert. Auf diese Weise wurden falsch positive Populationen durch überlappende Fluores-



**Abbildung 11** Analyse der Überschneidungen der Emissionsspektren von Fluorochromen zur Kompensationsberechnung der FACS-Messungen. Adaptiert von der Universität Salzburg (2020).

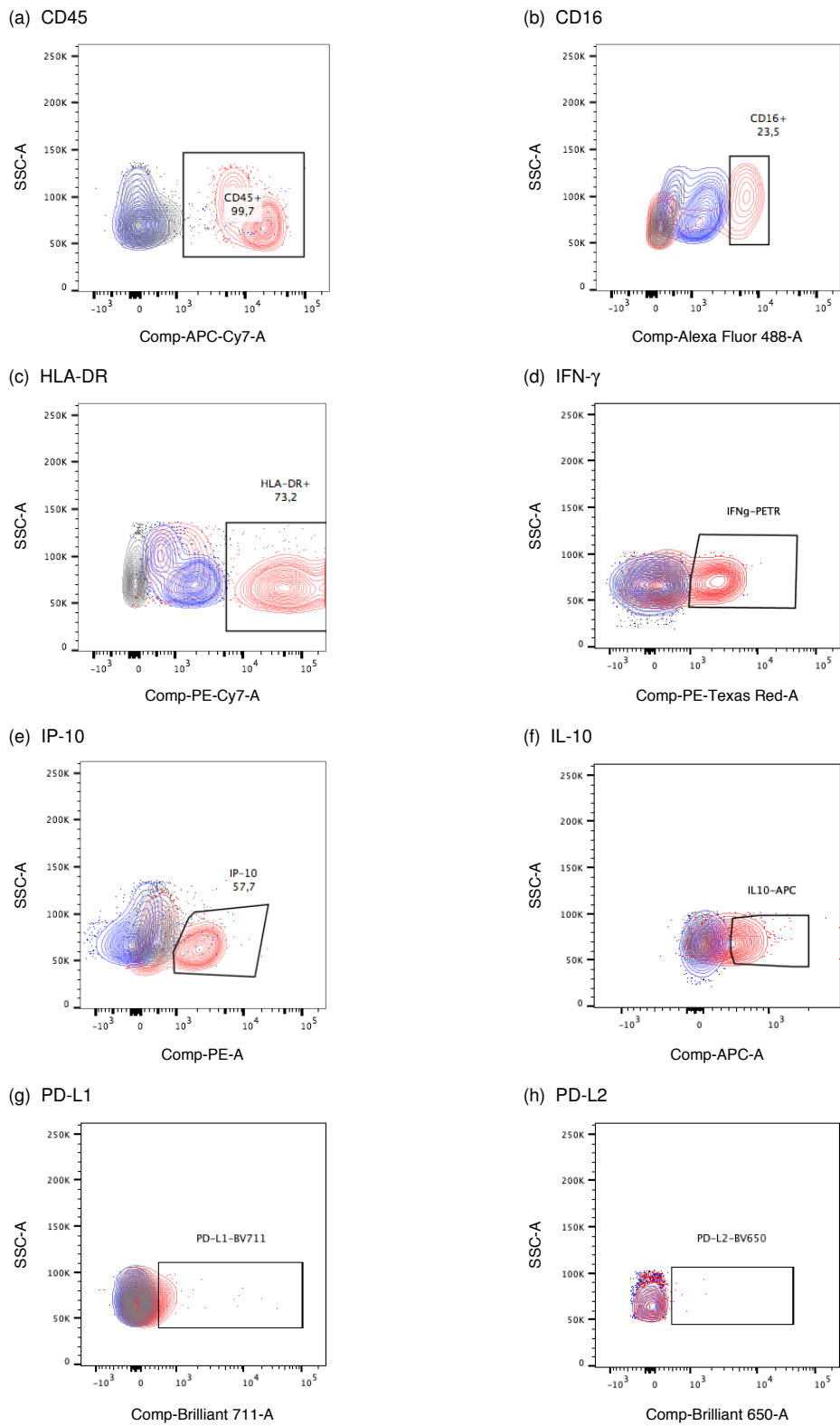
zenzsignale vermieden. Hierbei wurde das Prinzip der „Fluorescence Minus One (FMO)“ und „single colours“ angewandt, wobei sowohl die Information über das Spektrum des einzelnen Antikörpers als auch der Gesamtheit der anderen Antikörper genutzt wurde. Figure 11 verdeutlicht die Problematik der Überlagerung des elektromagnetischen Spektrums der fluoreszierenden Antikörper.

Außerdem dienten die Analysen von Isotyp-Kontrollantikörpern und ungefärbten Proben als weitere Kontrollmechanismen. Die Isotyp-Kontrollantikörper entstammten der gleichen Antikörperklasse wie die Antikörper, die für die Proben verwendet wurden, und stellten somit eine Negativkontrolle für die einzelnen Antikörpersignale dar. Die ungefärbten Proben dienten der Detektion der Autofluoreszenz der Zellen. In Figure 12 und Figure 13 sind die Färbungen der Isotyp-Kontrollantikörper dargestellt.

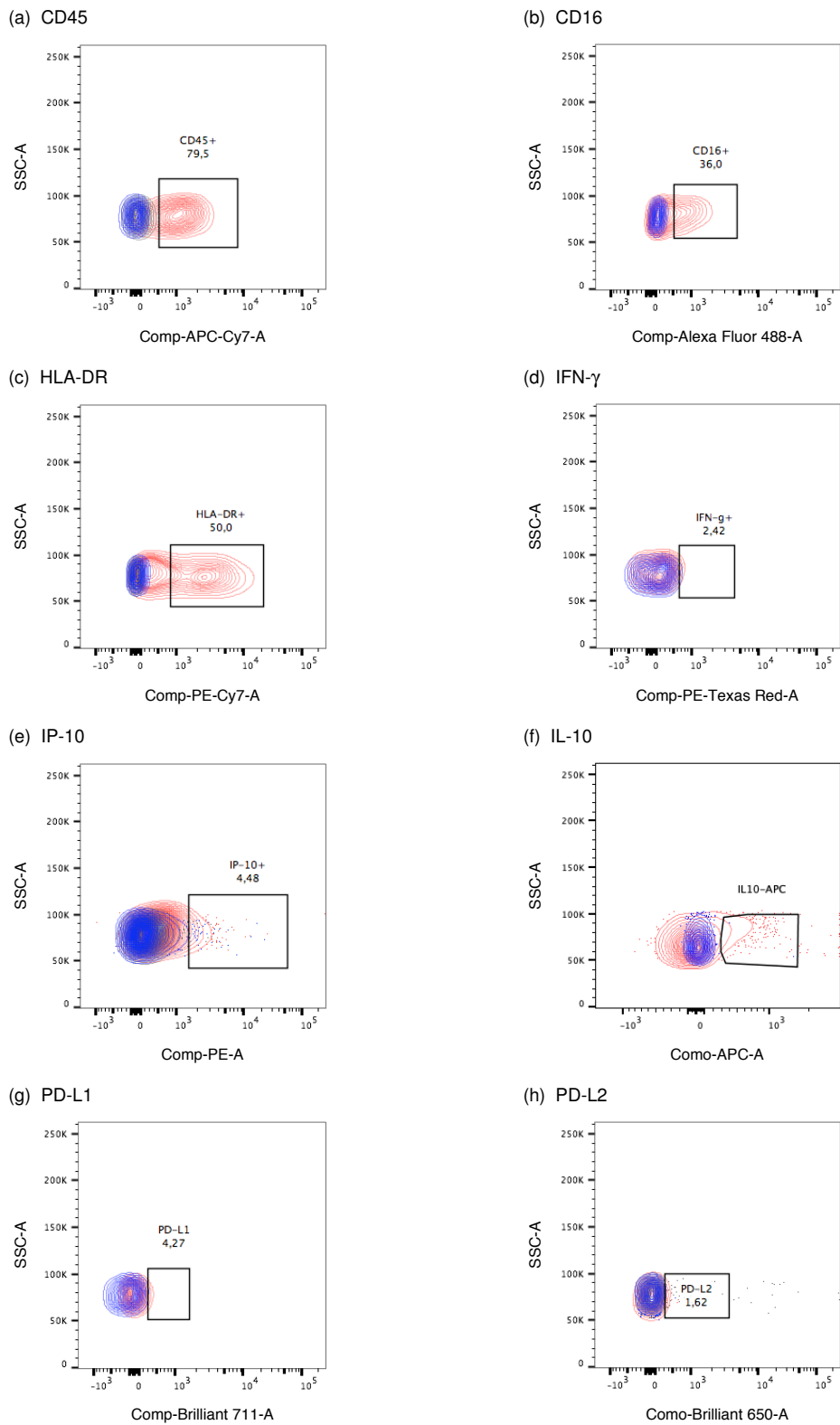
### 2.6.6. FACS-Färbung und -Auswertung

Die Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern erfolgte in vier Schritten: Blockierung des Fc-Rezeptors, Färbung zur Abgrenzung der toten Zellen, Färbung der Oberflächenantigene und zuletzt der intrazellulären Zielstrukturen.

Zu Beginn der Färbung wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Wells) jeweils vier Wells pro Studienteilnehmer beschriftet: Sputum ungefärbt, Sputum gefärbt, PBMC ungefärbt und PBMC gefärbt. Die aufgearbeiteten Zellen wurden in PBS resuspendiert und je 200 µl Sputum- und 100 µl PBMC-Zellsuspension in die spezifischen zwei Wells gegeben. Die Platte wurde bei 1200 rpm für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und es folgte die Blockierung des Fc-Rezeptors. Dieser Rezeptor wird von Immunzellen exprimiert und vermag vielfältig Antikörper im Rahmen der Immunabwehr zu binden (Murphy et al., 2018, S. 564, 565). Die Blockierung verhindert die unspezifische Bindung der Antikörper.



**Abbildung 12** Vergleich der Fluoreszenzsignale von FMO, single colours sowie Isotypen-Kontrollen des PBMC-Panels. Darstellung der Proben im Konturdiagramm mit Linien bei 5% Wahrscheinlichkeit mit außerhalb liegenden Zellen als Punktdarstellung. Eine Linie entspricht 5% der Zellpopulation. Blaue Linien stellen die Signale der FMO-Proben, rote Linien der single colours und graue Linien der Isotypen-Kontrollen dar.



**Abbildung 13** Vergleich der Fluoreszenzsignale von FMO sowie single colours des Sputum-Panels. Darstellung der Proben im Konturdiagramm mit Linien bei 5% Wahrscheinlichkeit mit außerhalb liegenden Zellen als Punktdarstellung. Eine Linie entspricht 5% der Zellpopulation. Blaue Linien stellen die Signale der FMO-Proben und rote Linien der single colours dar.



perfärbungen an diesen und somit falsch positive Ergebnisse. Hierfür erfolgte die Verdünnung der Blockierlösung (Human TruStain FcX) im Verhältnis 1 : 20 mit PBS. Anschließend wurden jeweils 50 µl dieser Verdünnung in die Wells pipettiert und die Mikrotiterplatte wurde für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zum Abschluss der Fc-Blockierung wurde pro Well 200 µl PBS hinzugegeben, die Platte bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zum Ausschluss von toten Zellen bei der Auswertung der Durchflusszytometrie diente eine spezifische Viabilitäts-Färbung. Diese kann durch permeable Zellwände diffundieren und somit tote Zellen zu demarkieren. Die Färbung (Fixable Viability Stain 520) wurde im Verhältnis 1 : 1000 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 50 µl dieser Verdünnung in die Wells der zwei gefärbten Proben gegeben. Zu den ungefärbten Proben wurde hingegen 50 µl PBS hinzupipettiert. Nach Resuspension der Wells erfolgte die Inkubation der Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 4 °C. Zum Abschluss der Fc-Blockierung wurde pro Well 200 µl PBS hinzugegeben, die Platte bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die Untersuchung der Monozyten (PBMC) und Makrophagen (Sputum) wurden sechs Antikörper mit extrazellulärer und drei mit intrazellulärer Zielstruktur ausgewählt. Für die Färbung der extrazellulären Antigene auf der Zelloberfläche erfolgte eine Verdünnung der sechs Antikörper im Verhältnis 1 : 200 mit gekühltem FACS-Puffer (10 % fetales Kälberserum (FCS) und 0,02 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) in PBS). 50 µl dieser Lösung wurde auf die gefärbten Proben pipettiert. Zu den ungefärbten Proben wurde hingegen 50 µl PBS hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit der Mikrotiterplatte von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde pro Well 200 µl PBS hinzugefügt. Die Platte wurde bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

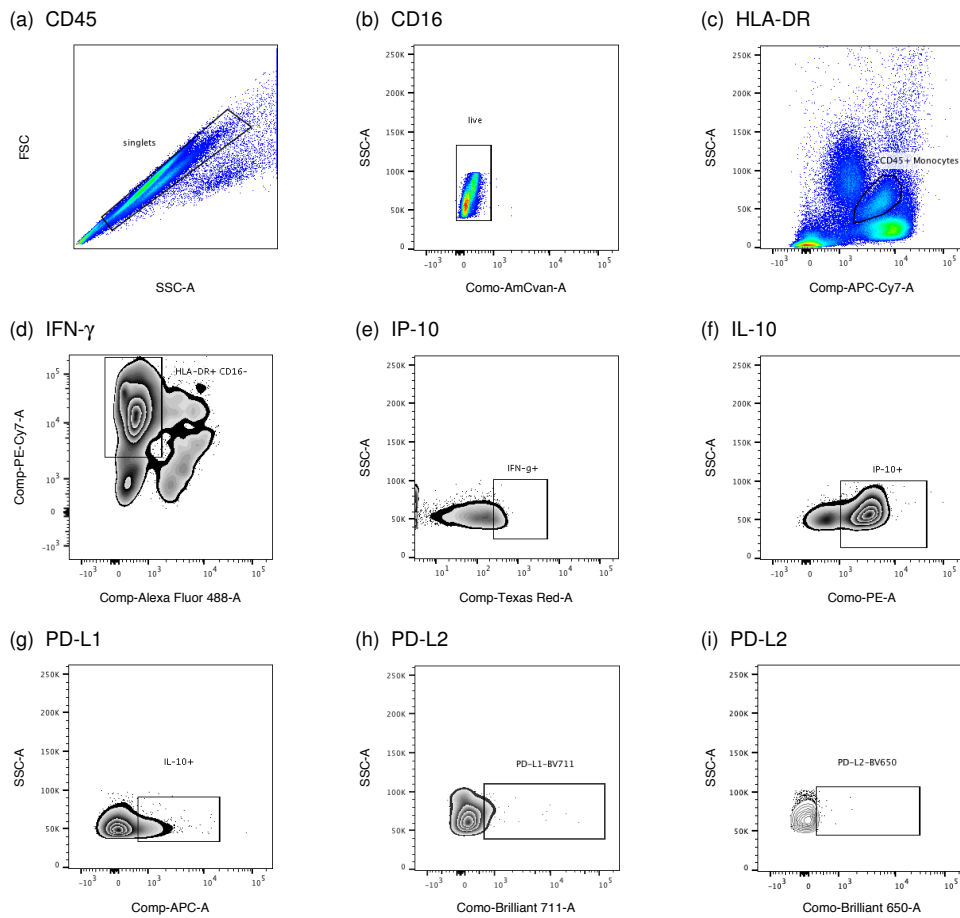
Für die Färbung von intrazellulären Zielstrukturen wurden die Zellen fixiert und die Zellmembran permeabilisiert, um das Eindringen der Antikörper in die Zelle zu ermöglichen. Die Fixierung erfolgte über die Vernetzung von umgebenden Proteinstrukturen. Hierfür wurde eine Lösung angesetzt, die im Verhältnis 1 : 3 aus FoxP3 Fixation / Permeabilization Concentrate und FoxP3 Fixation / Permeabilization Diluent bestand. Pro Well wurden 200 µl dieser Lösung hinzugegeben und nach Resuspension erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Mikrotiterplatte wurde während der Inkubation mittels Alufolie vor Licht geschützt, da dieses die Funktionsfähigkeit der Antikörper negativ beeinflusst. Anschließend wurden jeweils 100 µl PermWash-Lösung, welche im Verhältnis 1 : 10 aus Permeabilisierungspuffer und Aqua destillata bestand, in jedes Well pipettiert. Die PermWash-Lösung diente der Aufrechterhaltung der Löcher in der Zellmembran, welche für die intrazelluläre Färbung notwendig waren. Die Mikrotiterplatte wurde bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Hierauf wurde jedes Well erneut mit 100 µl PermWash-Lösung versetzt, die Platte verschlossen und lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C gelagert. Für die intrazelluläre Färbung am nächsten Tag wurden die drei Antikörper zunächst im Verhältnis 1 : 100 mit PermWash-Lösung verdünnt. Jeweils 50 µl dieser intrazellulären Lösung wurden nach der

Zentrifugation der Mikrotiterplatte bei 1200 rpm für fünf Minuten und Abwurf des Überstandes auf die gefärbten Proben pipettiert. Zu den ungefärbten Proben wurden hingegen 50 µl reine Perm-Wash-Lösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde jeweils 100 µl PermWash-Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die finale Messung der Proben mit dem Durchflusszytometer wurden diese mit 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen mit weiteren 200 µl FACS-Puffer überführt. Zuerst wurden die PBMC-Proben eingelesen. Danach erfolgte eine Reinigung des Durchflusszytometers mit jeweils fünf Minuten FACS-Clean-Lösung, FACS-Rinse-Lösung und Aqua destillata. Im nächsten Schritt wurden die Sputum-Proben eingelesen. Am Ende wurde das Durchflusszytometer jeweils 20 Minuten mit FACS-Clean-Lösung, FACS-Rinse-Lösung und Aqua destillata durchgespült.

Die Analyse der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe von zweidimensionalen Streudiagrammen. Die X- und Y-Achsen bildeten die Höhe der Streuung des Laserlichtes oder die Detektion der Fluoreszenzsignale der verschiedenen Antikörper. Die einzelnen Schritte der Analyse sind in den Abbildungen 14 und 16 dargestellt. Um die zu analysierende Gruppe wurde im Graphen ein Vieleck (Gate) gelegt, woraufhin der prozentuale Anteil dieser Gruppe bestimmt und die ausgewählten Zellen in weiteren Graphen präziser untersucht und unterteilt werden konnten. Diese Analyse erfolgte durch das Programm FlowJo. Die Abbildungen 15 und 17 zeigen jeweils ein Beispiel für die Darstellung des Gating-Prozesses im FlowJo-Programm für Monozyten beziehungsweise Makrophagen.

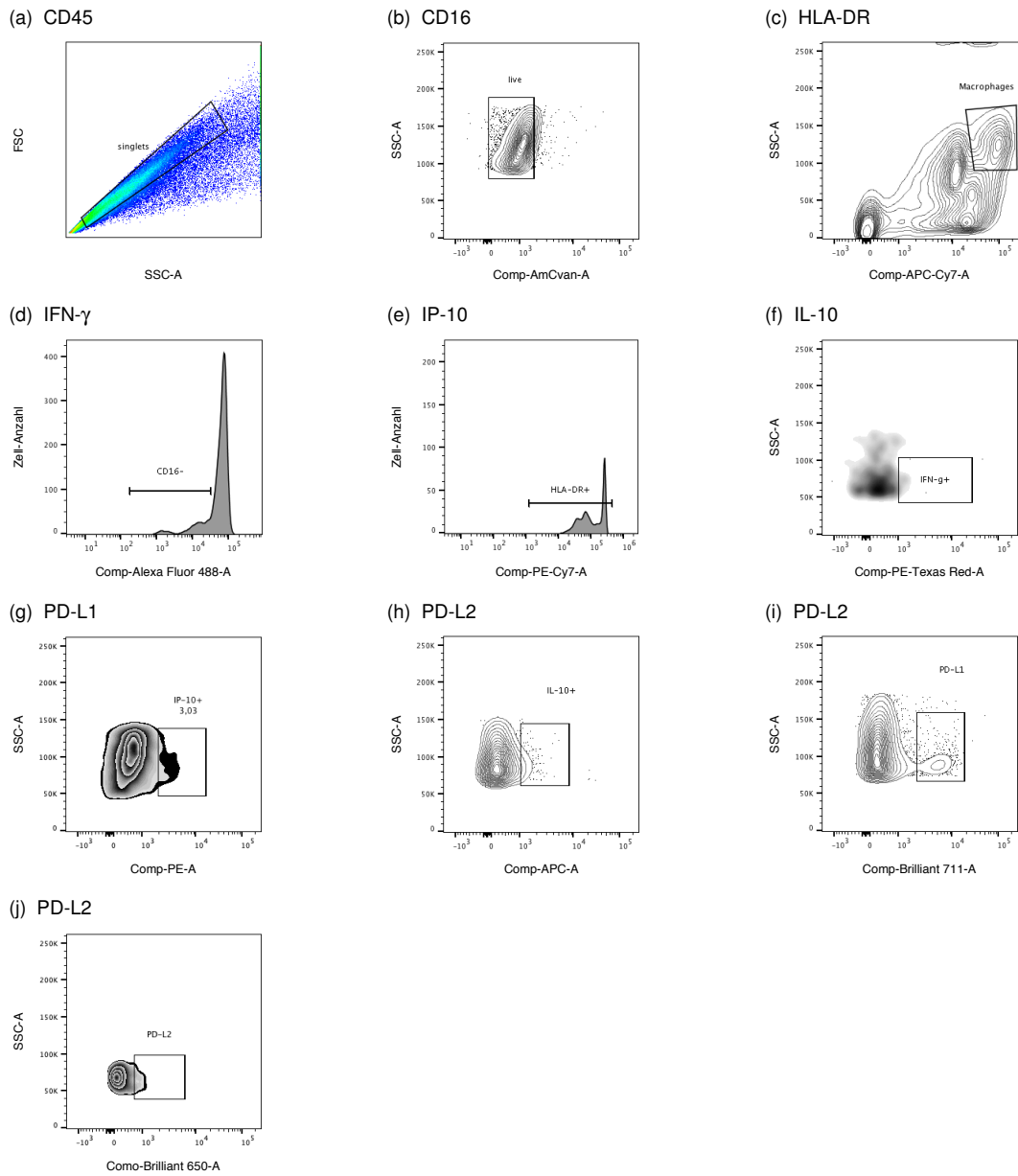
Im ersten Schritt wurde ein Gate ausschließlich um die freien einzelnen Zellen (singlets) gelegt. Hierfür wurden im Graphen die Achsen der unterschiedlichen Höhe (FSC-H) und Fläche (FSC-A) der Vorwärtsstreuung gegeneinander aufgetragen. Doubletten, Zellzusammenhänge von mehr als zwei Zellen und Zellbruch konnten auf diese Weise von der Einzelzellpopulation getrennt werden. Durch den fixierbaren Viabilitätsfarbstoff (FVS) konnten lediglich die lebenden Zellen für die weitere Auswertung ausgewählt werden. Im nächsten Schritt wurde die Fläche im Seitwärtsstreulicht (SSC-A) gegen den Leukozytenmarker CD45 aufgetragen. Anhand der spezifischen Seitwärtsstreuung wurden CD45<sup>+</sup>-Monozyten in der PBMC-Probe und Makrophagen in der Sputumprobe ausgewählt. In diesem Schritt wurden durch eine unterschiedliche Granularität Lymphozyten und Granulozyten ausgeschlossen. Im Folgenden wurden die CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen ausgewählt (Abeles et al., 2012; Lay, Peden & Alexis, 2011; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Zuletzt sind diese Zellen auf die Marker IFN-γ induziertes Protein (IP)-10, IFN-γ, IL-10, PD-L1, PD-L2 geprüft und der prozentuale Anteil positiver Zellen jeweils ausgewertet worden. Der Gating-Prozess der Monozyten- sowie Makrophagen-Population ist in der Figure 14 beziehungsweise Figure 16 zu finden.



**Abbildung 14** Gating-Strategie der Monozyten-Population. Darstellung der Proben als farbige Punkte mit Farbwechsel bei Dichtezunahme (a-c), im Konturdiagramm mit Graustufen für die Dichtedarstellung (d-h) oder im Konturdiagramm mit Linien bei 5% Wahrscheinlichkeit mit außerhalb liegenden Zellen als Punktdarstellung (i).

| Name                    | Statistic | #Cells |
|-------------------------|-----------|--------|
| LL017-W_stained.fcs     |           | 250000 |
| ▼ singlets              | 50,1      | 125192 |
| ▼ Lymphocytes+Monocytes | 99,7      | 124853 |
| ▼ Monocytes             | 33,8      | 42208  |
| ▼ live                  | 99,6      | 42020  |
| ▼ CD45+                 | 70,6      | 29662  |
| ▼ HLA-DR+ CD16-         | 86,9      | 25783  |
| ▶ IFN-g+                | 0,73      | 188    |
| ▶ IL-10+                | 0,97      | 250    |
| ▶ IP-10+                | 93,4      | 24070  |
| ▶ PD-L1+                | 2,37      | 612    |
| ▶ PD-L2+                | 3,12      | 805    |

**Abbildung 15** Gating-Prozess der Monozyten-Population im FlowJo-Programm. Die erste Spalte benennt die stufenförmige Eingrenzung der Zellpopulation, die zweite Spalte stellt den prozentualen Anteil der Population in Bezug zur vorhergehenden Stufe und die dritte Spalte die absolute Zellanzahl der Population dar.



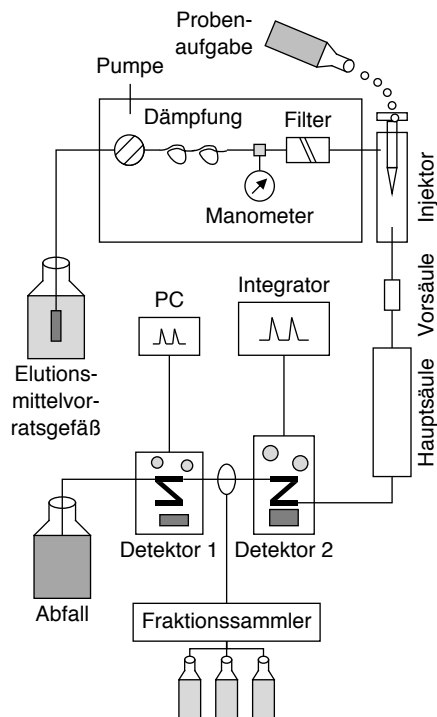
**Abbildung 16** Gating-Strategie der Makrophagen-Population. Darstellung der Proben als farbige Punkte mit Farbwechsel bei Dichtezunahme (a), im Histogramm bei eindimensionaler Aufteilung (d,e), im Konturdiagramm mit Graustufen für die Dichtedarstellung (g,i) oder im Konturdiagramm mit Linien bei 5% Wahrscheinlichkeit mit außerhalb liegenden Zellen als Punktdarstellung (b,c,h,i).

| Name                        | Statistic | #Cells |
|-----------------------------|-----------|--------|
| LL017-W_stained.fcs         |           | 155152 |
| ▼ singlets                  | 30,1      | 46729  |
| ▶ Lymphocytes + Macrophages | 47,4      | 22159  |
| ▼ Macrophages               | 25,0      | 11704  |
| ▼ live                      | 87,9      | 10287  |
| ▼ CD16-                     | 89,9      | 9246   |
| ▼ HLA-DR+                   | 90,1      | 8334   |
| ▼ IFN-g+                    | 1,27      | 106    |
| ▶ IP-10+                    | 5,66      | 6      |
| ▶ PD-L1                     | 0         | 0      |
| ▶ PD-L2                     | 17,9      | 19     |
| ▶ IL-10+                    | 47,4      | 3951   |
| ▶ IP-10+                    | 0,20      | 17     |
| ▶ PD-L1                     | 0,072     | 6      |
| ▶ PD-L2                     | 2,05      | 171    |

**Abbildung 17** Gating-Prozess der Makrophagen-Population im FlowJo-Programm. Die erste Spalte benennt die stufenförmige Eingrenzung der Zellpopulation, die zweite Spalte stellt den prozentualen Anteil der Population in Bezug zur vorhergehenden Stufe und die dritte Spalte die absolute Zellanzahl der Population dar.

### 2.6.7. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Die Messung des Moleküls Neopterin erfolgte in Sputum- und Serumüberständen durch einen kompetitiven enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (BRAHMS Neopterin EIA) mit einer Sensitivität von 2 ng/mol (Mayersbach, 2010). Dieser wurde in Kooperation mit dem Biozentrum der Medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt. Dieser Test bestimmt die Konzentration von Molekülen mit Hilfe von Antikörper-Antigen-Reaktionen. Bei einem kompetitiven enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) konkurrieren das gesuchte Molekül – Neopterin – und ein ähnliches Antigen, welches mit einem Enzym konjugiert ist, um die Bindungsstelle am Antikörper, welcher am Boden der Mikrotiterplatte gebunden ist. Das Enzym am Antigen löste bei Zugabe der Lumineszenz-Lösung (4-Nitrophenylphosphat) eine Farbreaktion aus. Je höher die Neopterin-Konzentration in der Probe desto weniger des Enzym-konjugierten Antigens haben den Antikörper gebunden und desto schwächer fiel im Folgenden die Farbreaktion aus (Murphy et al., 2018, S. 986, 987). Infolgedessen verhielt sich die mit einem Laser bei 405 nm detektierte Farbreaktion (optische Dichte) in den Proben antiproportional zur Neopterin-Konzentration. Zur Bestimmung der genauen Konzentrationen dienten Standardproben mit bekanntem Neopterin-Gehalt. Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt und Kontroll-Sera wurden verwendet. Jeweils ein Kryoröhrchen mit Serum- und ein Kryoröhrchen mit Sputumüberstand wurden pro Teilnehmer pro Saison gemessen. Zum Zeitpunkt der Messung waren die Überstände der IS maximal 14 Monate eingefroren und die Proben der OS acht Monate.



**Abbildung 18** Aufbau einer HPLC-Apparatur. Basiert auf Gey (2015).

### 2.6.8. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Tryptophan und Kynurenin Konzentrationen wurden mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Diese Messungen wurden in Kooperation mit dem Biozentrum der Medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt. Hierbei erfolgte die Trennung der zu untersuchenden Substanzen durch die Nutzung des Adsorptionsverhaltens gegenüber polaren Lösungen. Anschließend fand der Nachweis der Substanzen durch einen UV-/Fluoreszenz-Detektor statt (Gey, 2015, S. 107). Zur Validierung der Messung wurde sowohl ein interner als auch ein externer Kalibrator verwendet (Widner, Werner, Schennach, Wachter & Fuchs, 1997). Figure 18 zeigt den Aufbau einer HPLC-Apparatur.

Für die Durchführung der HPLC wurde zunächst der interne Kalibrator hergestellt, der im Folgenden zusammen mit den Proben der Studienteilnehmer gemessen wurde. Der interne Kalibrator 3-Nitro-L-Tyrosin wurde in einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  im Kalium-Phosphatpuffer ( $0,05 \text{ mol/l}$ , pH 6,0) angesetzt. Pro Studienteilnehmer wurden pro Saison je  $100 \mu\text{l}$  des aufgetauten Serum- und Sputumüberstandes mit je  $100 \mu\text{l}$  des Puffers zusammengegeben. Hierauf erfolgte die Fällung der angesetzten Lösungen mit  $50 \mu\text{l}$  Trichloressigsäure ( $2 \text{ mol/l}$ ). Die Proben wurden mit dem Vortex-Gerät durchmischt und für zehn Minuten bei  $13\,000 \text{ g}$  zentrifugiert. Anschließend wurden  $150 \mu\text{l}$  der Probe in ein Mikroröhrchen des automatischen Probengebers überführt. Die externe Kalibrierung erfolgte durch frisch aufgetaute Tryptophan- und Kynurenin-Standardlösungen ( $1 \text{ mmol/l}$ ) in bidestilliertem Wasser und Albumin ( $70 \text{ g/l}$ ).  $50 \mu\text{l}$  Tryptophan,  $10 \mu\text{l}$  Kynurenin und  $940 \mu\text{l}$  Albumin-Standardlösung wurden zur Herstellung des Kalibrators verwendet.  $200 \mu\text{l}$  Aliquots dieser Lösung wurden im Folgenden wie die Proben gemessen. Umkehrphase-Kartuschen mit einer polaren Phase

(LiChroCART RP18-Säulen, Merck) wurden für die Trennung genutzt. Eine entgaste Kaliumphosphatlösung (0,015 mol/l, pH 6,4) mit 27 ml/l Acetonitril wurde als Elutionspuffer für die Umkehrphasenchromatografie verwendet. Die Proben wurden bei einer Durchflussrate von 0,9 ml/min und einer Temperatur von 25 °C analysiert.

Tryptophan wurde im Folgenden mittels Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm und einer Emissionswellenlänge von 365 nm nachgewiesen. Kynurenin wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm durch einen UV-Detektor gemessen. Die IDO Aktivität wurde berechnet als Quotient aus Kynurenin und Tryptophan Werten: KYN [ $\mu\text{mol}$ ]/TRP [ $\text{mmol}$ ] (Widner et al., 1997). Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt. Zum Zeitpunkt der Messung waren die Überstände der IS maximal 14 Monate eingefroren und die Proben der OS acht Monate.

## 2.7. Statistische Testverfahren

Für die statistische Analyse und Darstellung der Daten wurde das Programm Prism verwendet. Die Daten wurden, sofern nicht anders beschrieben, in den Abbildungen mittels zweidimensionalen Streudiagramm visualisiert, wobei der Mittelwert hervorgehoben ist. Jeder Punkt repräsentiert den entsprechenden Wert eines Studienteilnehmers. Die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Gruppen wurde abhängig von Normalverteilung und Verbundenheit überprüft. Die jeweiligen Testverfahren sind in Table 8 aufgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test wurde für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen verwendet. Dieser setzt keine Normalverteilung der Stichproben voraus. Die Kennzeichnung des Signifikanzniveaus orientierte sich am Wahrscheinlichkeitswert (p-Wert) und ist in Table 9 näher erklärt.

| Verteilung                    | Unverbunden         | Verbunden                     |
|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| nicht-normalverteilte Gruppen | Mann-Whitney-U-Test | Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test |
| normalverteilte Gruppen       | ungepaarter t-Test  | gepaarter t-Test              |

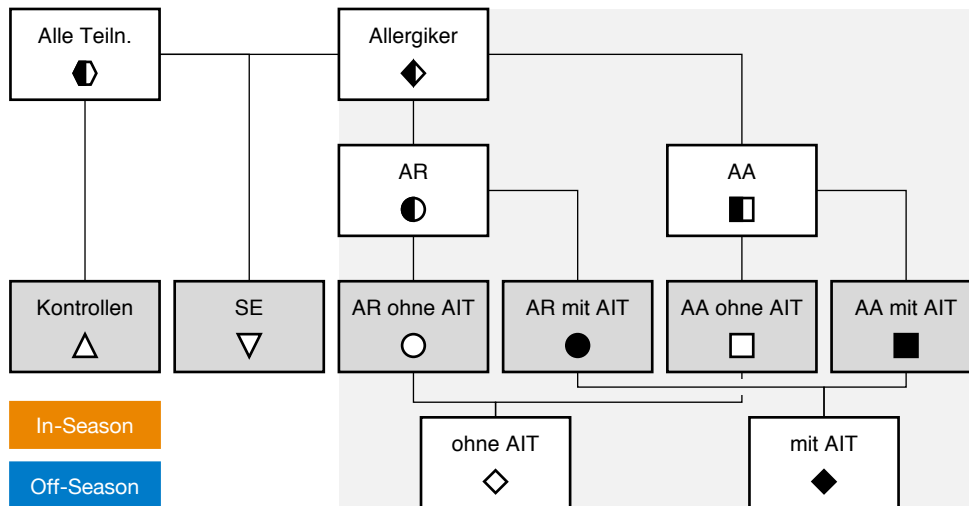
**Table 8** Statistische Testverfahren für den Vergleich zweier Gruppen

| p-Wert        | $\leq 0,05$ | $\leq 0,01$ | $\leq 0,001$ |
|---------------|-------------|-------------|--------------|
| Kennzeichnung | *           | **          | ***          |

**Table 9** Kennzeichnung des Signifikanzniveaus in den Abbildungen

### 3. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in vier Abschnitten: klinische Daten, Labordiagnostik der systemischen Ebene (Blut), der lokalen Ebene (Sputum) und der Vergleich der beiden Ebenen. Pro Abschnitt werden die jeweiligen Messmethoden hintereinander aufgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt – sofern nicht anders vermerkt – durch zweidimensionale Streudiagramme, wobei jeweils der Mittelwert einer Gruppe hervorgehoben ist. Jeder Marker repräsentiert den entsprechenden Wert eines Studienteilnehmers. In Figure 19 aufgeführte Marker dienen der graphischen Darstellung der einzelnen Gruppen. Für den Vergleich der Mittelwerte sind diese mit dem Standardfehler angegeben. Vereinzelt wurden extreme Messwerte beobachtet. Für eine bessere Lesbarkeit der Streudiagramme werden diese separat dargestellt.



**Abbildung 19** Darstellung der Gruppen des Studienkollektivs mit den jeweiligen Symbolen für die graphische Repräsentation der Ergebnisse. Teiln. = Teilnehmer

#### 3.1. Klinische Daten

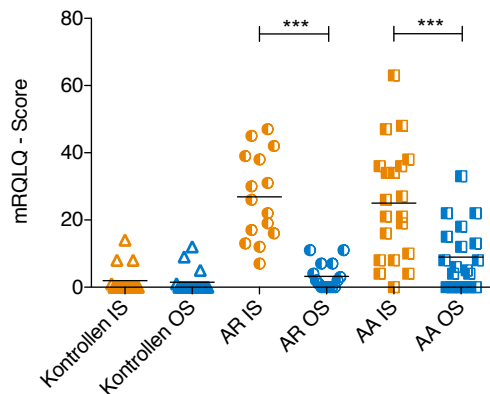
##### 3.1.1. Untersuchungskollektiv

Sowohl in der Allergiesaison (IS) als auch außerhalb der Allergiesaison (OS) wurden die Daten von 58 Studienteilnehmern ausgewertet. Die Verteilung des Alters, Geschlechts und des BMI sind in Table 10 dargestellt. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechts- und der BMI-Verteilung gemessen (Kruskal-Wallis-Test  $p > 0,05$ ). Die Studienteilnehmer waren zwischen 18 und 50 Jahren alt. Die Gruppe der AA mit AIT war signifikant älter gegenüber der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR ohne AIT und der Gruppe der SE (Kruskal-Wallis-Test  $p < 0,001$ ).



|                           | Kontrollen | AR o. AIT  | AR mit AIT | AA o. AIT  | AA mit AIT | SE         |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Alter                     | 22 (19–33) | 21 (19–23) | 25 (22–31) | 24 (18–38) | 31 (24–50) | 22 (20–29) |
| Geschlecht<br>[Anz. m/ w] | 8/10       | 4/3        | 3/5        | 4/5        | 9/2        | 4/3        |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ]  | 21 (18–26) | 22 (20–29) | 22 (19–25) | 23 (19–33) | 24 (21–30) | 22 (18–24) |

**Tabelle 10** Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer. Die Darstellung der Werte der einzelnen Gruppen erfolgte durch den Median (Spannweite).



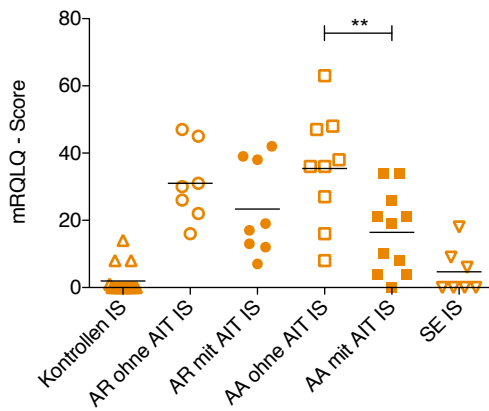
**Abbildung 20** Vergleich der Symptombelastungen im mRQLQ-Fragebogen in der IS und der OS zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR und der Gruppe der AA. Sowohl die Gruppe der AR (IS:  $26,9 \pm 3,4$  und OS:  $3,2 \pm 1,0$ ) als auch die Gruppe der AA (IS:  $25,0 \pm 3,8$  und OS:  $8,9 \pm 2,2$ ) gaben in der Allergiesaison verstärkt eine Belastung durch die allergischen Symptome an (gepaarter t-Test  $p < 0,001$ ).

### 3.1.2. Allergologische Diagnostik

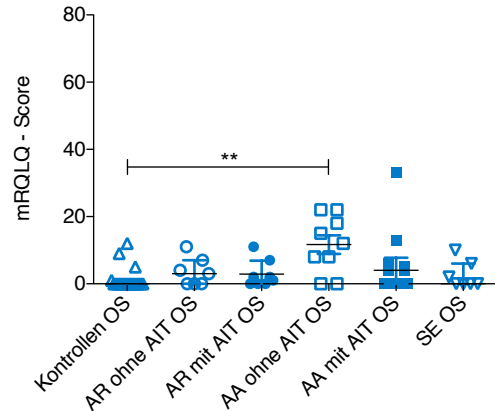
Die allergologischen Daten umfassen drei Abschnitte: Fragebögen, Lungenfunktionsdiagnostik und IgE-Werte. Die Analyse dieser Daten ermöglicht eine klinische Beurteilung der allergischen Erkrankung des Untersuchungskollektives.

Die Auswertung des mRQLQ zeigte, dass Studienteilnehmer mit einer allergischen Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe vor allem während des Pollenfluges verstärkt an allergischen Symptomen litten (Kruskal-Wallis Test  $p < 0,001$ , Figure 20). Die Gruppe der SE (IS:  $4,7 \pm 2,6$  und OS:  $2,6 \pm 1,5$ ) zeigte gegenüber der Kontrollgruppe (IS:  $1,9 \pm 1,1$  und OS:  $1,5 \pm 0,8$ ) keine signifikant erhöhte Symptombelastung (Mann-Whitney-U-Test  $p > 0,05$ ). Außerhalb der Pollenflugsaison gab die Gruppe der AA ( $8,9 \pm 2,2$ ) signifikant mehr Symptombelastung als die Gruppe der AR ( $3,2 \pm 1,0$ ) an (ungepaarter t-Test  $p = 0,04$ ). In Figure 21 ist die Verteilung der mRQLQ-Scores der Untergruppen dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die Gruppe der AA ohne AIT den jeweils höchsten mRQLQ-Score angab.

Der PSQ-Fragebogen hatte das Ziel, die psychosoziale Belastung der Patienten aufzuzeigen. Figure 22 zeigt die Verteilung des PSQ-Scores in der IS. Die Gruppe der AA ohne AIT wies einen erhöhten PSQ-Score auf. In der OS zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

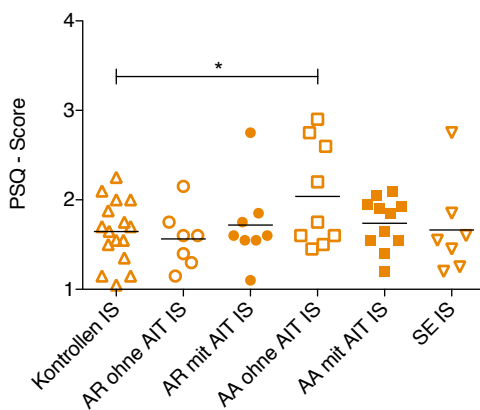


(a) In-Season



(b) Off-Season

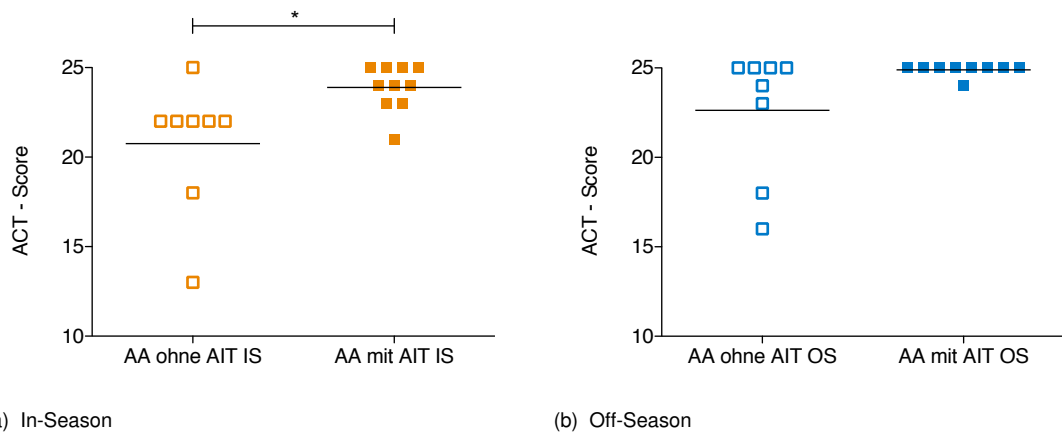
**Abbildung 21** Vergleich der Symptombelastungen im mRQLQ-Fragebogen zwischen den Untergruppen in der IS (a) und in der OS (b). Die Gruppe der AA ohne AIT (IS:  $35,4 \pm 5,6$ ) beschrieb eine signifikant verstärkte Symptombelastung im Vergleich zu den AA mit AIT (IS:  $16,5 \pm 3,6$ ) in der IS (ungepaarter t-Test  $p = 0,009$ ). In der OS erreichte die Gruppe der AA ohne AIT ( $11,7 \pm 2,8$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1,5 \pm 0,8$ ) einen signifikant erhöhten mRQLQ-Score (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,02$ ).



**Abbildung 22** Vergleich der Angaben des subjektiven Belastungsempfindens im PSQ-Fragebogen in der IS. Die Gruppe der AA ohne AIT ( $2,0 \pm 0,2$ ) gab im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1,6 \pm 0,1$ ) signifikant mehr Belastungen im Alltag an (ungepaarter t-Test  $p = 0,045$ ).

Der ACT-Fragebogen diente der Beurteilung der Kontrolle des Asthmas. Die Gruppe der AA mit AIT erreichte im Durchschnitt höhere Werte im Vergleich zur Gruppe der AA ohne AIT, welche für ein besser kontrolliertes Asthma sprechen. Figure 23 zeigt die Verteilung in der IS sowie der OS.

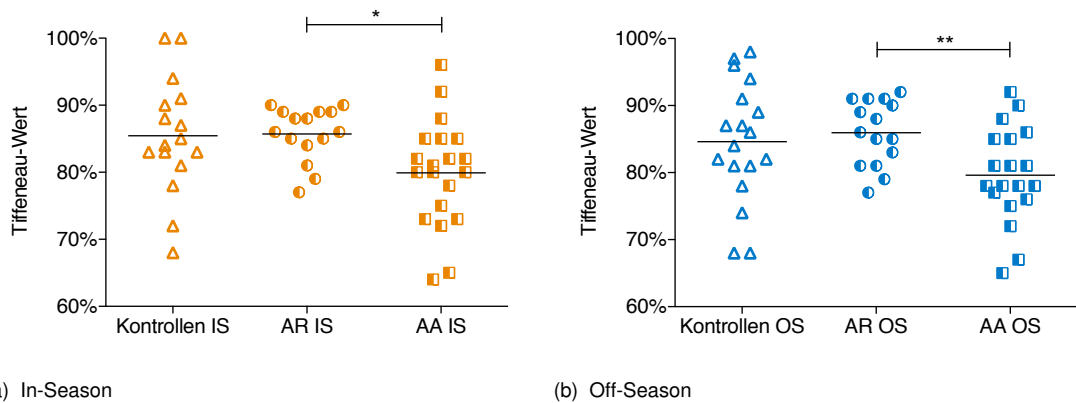
Die Lungenfunktionsdiagnostik wurde für die Beurteilung der bronchialen Obstruktion und somit der Evaluation der asthmatischen Komponente der allergischen Erkrankung durchgeführt. Als Tiffeneau-Wert wird der Quotient aus FEV1 und FVC bezeichnet, welcher die Grundlage für die Beurteilung obstruktiver Ventilationsstörungen wie Asthma bildet. Die Lungenfunktionsdiagnostik ergab einen signifikant niedrigeren Tiffeneau-Wert in der Gruppe der AA im Vergleich zur Gruppe der AR (Figure 24). Die Analyse der Untergruppen ergab einen signi-



(a) In-Season

(b) Off-Season

**Abbildung 23** Punktevergleich im Asthmakontrolltest der Gruppe der AA mit und ohne AIT in der IS (a) und in der OS (b). AA mit AIT erreichten einen signifikant höheren Wert ( $23,9 \pm 0,4$ ) als die Gruppe der AA ohne AIT in der IS ( $20,8 \pm 1,3$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,016$ ). In der OS war der Unterschied nicht signifikant ( $24,9 \pm 0,1$  beziehungsweise  $22,6 \pm 1,3$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,07$ ).



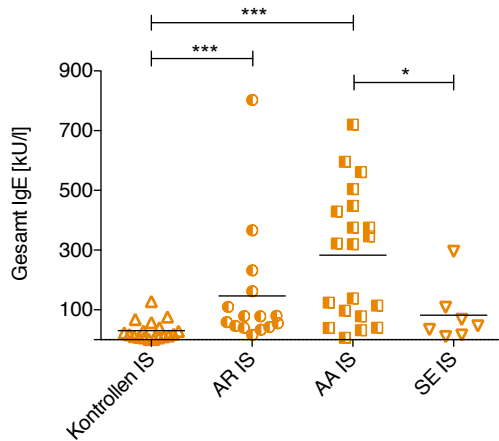
(a) In-Season

(b) Off-Season

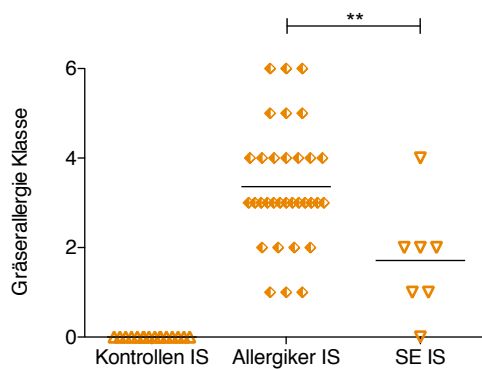
**Abbildung 24** Prozentualer Vergleich der Tiffeneau-Werte zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR und der AA in der IS (a) und OS (b). Die Lungenfunktionsdiagnostik ergab einen signifikant niedrigeren Tiffeneau-Wert in der Gruppe der AA (IS:  $79,9 \pm 1,8\%$  und OS:  $79,6 \pm 1,6\%$ ) im Vergleich zur Gruppe der AR (IS:  $85,7 \pm 1,0\%$  und OS:  $85,9 \pm 1,3\%$ , IS ungepaarter t-Test  $p = 0,015$  und OS ungepaarter t-Test  $p = 0,006$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (IS:  $85,4 \pm 2,2\%$  und OS:  $84,6 \pm 2,1\%$ ) war der Unterschied nicht signifikant (IS ungepaarter t-Test  $p = 0,056$  und OS ungepaarter t-Test  $p = 0,07$ ).

fikant geringeren Tiffeneau-Wert in der Gruppe der AA mit AIT (IS:  $77,8 \pm 1,9\%$  und OS:  $77,7 \pm 1,8\%$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe (IS:  $85,4 \pm 2,2\%$  und OS:  $84,6 \pm 2,1\%$ ) (ungepaarter t-Test  $p = 0,02$ ). Es bestand keine signifikante Differenz zwischen der Gruppe der AA mit und ohne AIT (IS und OS ungepaarter t-Test  $p > 0,05$ ).

IgE stellt einen zentralen Botenstoff in der Vermittlung der allergischen Reaktion vom Soforttyp dar. Aus diesem Grund gilt ein erhöhter IgE-Gesamtwert als Indikator für allergische Erkrankungen. Durch die Messung spezieller IgE-Werte wie dem Gräserpollen-IgE können Rückschlüsse auf das spezifische Allergen des Patienten gezogen werden. Die Höhe des speziellen IgE-Titers bestimmt die Allergiekategorie. Die Analyse der IgE-Messungen zeigte, dass die Gruppen der AR und der AA im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl erhöhte IgE-Gesamtwerte (Figure 25) als auch gräser-spezifische IgE-Werte aufwiesen. Die Einteilung in Allergieklassen bezüglich der Gräserpollenallergie zeigt keine signifikanten Unterschiede

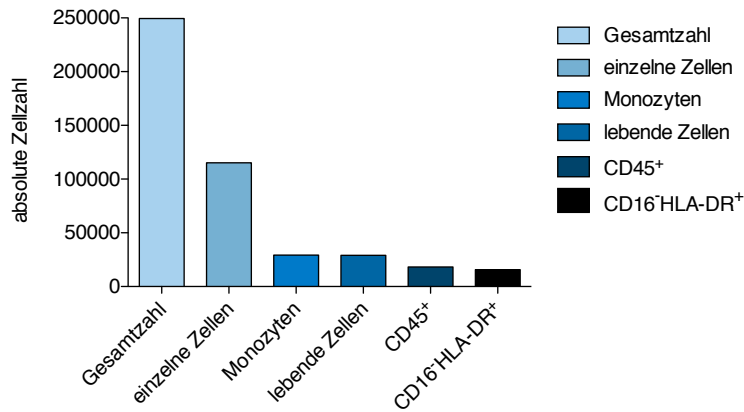


**Abbildung 25** Vergleich der IgE-Gesamtwerte zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der AA und der SE. Die Gruppe der AR ( $146,7 \pm 52,6$  kU/l) sowie der AA ( $283,2 \pm 48,6$  kU/l) zeigte einen signifikant höheren IgE-Gesamtwert als die Gruppe der Kontrollen ( $30,0 \pm 7,8$  kU/l) (Mann-Whitney-U-Test  $p < 0,001$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der AR und der AA (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,06$ ). Ebenfalls wies die Gruppe der SE ( $83,4 \pm 37,8$  kU/l) keinen signifikant höheren Wert als die Kontrollgruppe auf (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,10$ ).

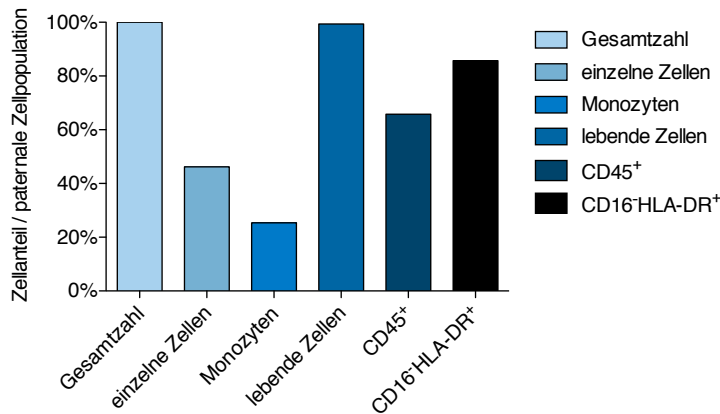


**Abbildung 26** Vergleich der Einteilung in die Gräserallergie-Klassen zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE. Die Allergiker ( $3,4 \pm 0,2$ ) zeigten im Vergleich zur Gruppe der SE (Median:  $1,7 \pm 0,5$ ) eine signifikant höhere Gräserallergie-Klasse (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,007$ ).

zwischen den einzelnen Gruppen der Allergiker. Die Gruppe der SE wies eine signifikant niedrigere Allergiekategorie gegenüber den Allergikern, jedoch eine höhere Klasse gegenüber der Kontrollgruppe auf (Figure 26). Sowohl die IgE-Gesamtwerte als auch die gräser-spezifischen IgE-Werte korrelierten positiv mit der Symptombelastung des mRQLQ-Fragebogens (Spearman  $r = 0,47, p < 0,001$  beziehungsweise  $r = 0,65, p < 0,001$ ).



**Abbildung 27** Vergleich der durchschnittlich absoluten Zellzahlen im Gating-Prozess der Monozyten in den PBMC.



**Abbildung 28** Darstellung der durchschnittlich relativen Zellzahlen der einzelnen Eingrenzungsschritte im Gating-Prozess der Monozyten in den PBMC in Bezug zur höheren Hierarchiestufe.

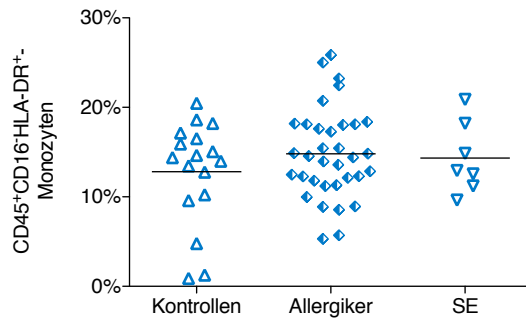
## 3.2. Systemische Labordiagnostik

Auf systemischer Ebene analysierte diese Arbeit einerseits Monozyten, welche aus den PBMC gewonnen wurden, und andererseits den Serumüberstand der Blutproben.

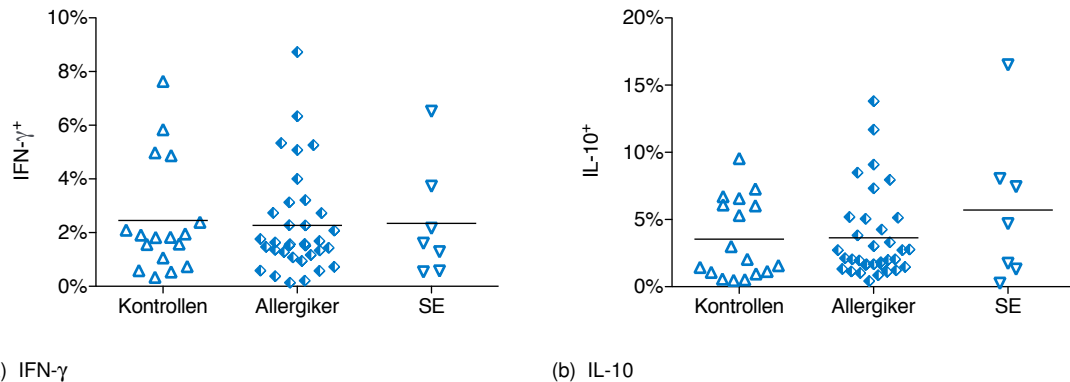
### 3.2.1. PBMC

Monozyten gehören zu den PBMC. Im Rahmen der Gating-Strategie der Durchflusszytometrieanalyse wurden die Monozyten von den anderen PBMC getrennt. Hierbei wurden die Monozyten mithilfe folgender drei Oberflächenmoleküle ausgewählt: CD45<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> und HLA-DR<sup>+</sup>. Figure 27 und 28 zeigen die durchschnittlich absoluten sowie relativen Zellzahlen der jeweiligen Stufe der Zellauswahl. Im Durchschnitt wurden 15 820 CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten analysiert.

Die Analyse des Anteils der CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten hinsichtlich der CD45<sup>+</sup>-PBMC zeigte, dass der Anteil an CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten durchschnittlich  $85,80 \pm 0,07\%$  betrug.



**Abbildung 29** Vergleich des prozentualen Anteils an CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten der PBMC zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE. Die Auswertung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen: Kontrollgruppe (12,8 ± 1,4 %), Allergiker (14,8 ± 0,9 %) und Gruppe der SE (14,3 ± 1,5 %, Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

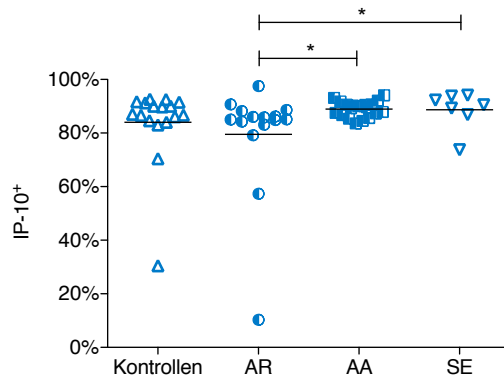


**Abbildung 30** Vergleich des prozentualen Anteils der IFN- $\gamma$  (a) und IL-10 (b) produzierenden Monozyten zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE, Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ .

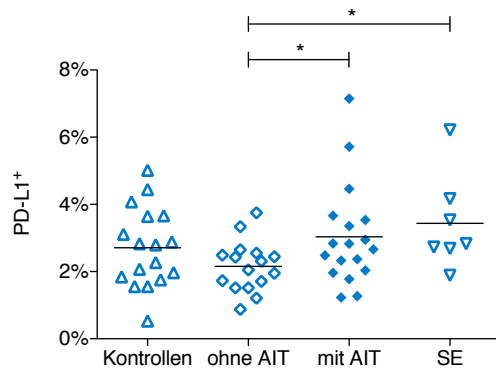
Die Auswertung des prozentualen Anteils der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten in Bezug zu den gesamten PBMC zeigte, dass der Anteil an Monozyten durchschnittlich 14,20 ± 0,05 % der gesamten PBMC betrug. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen (Figure 29). Auch die Analyse der Untergruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

Die CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten wurden für die weitere Analyse auf die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10 und IP-10 untersucht. Außerdem wurde die Expression der Transmembranliganden PD-L1 sowie PD-L2 ermittelt. Die CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten werden im Folgenden aus Rücksicht auf die Lesbarkeit vereinfachend als Monozyten bezeichnet.

Die Auswertung der IFN- $\gamma$ -Produktion der Monozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen: Kontrollgruppe 2,5 ± 0,5 %, Allergiker 2,3 ± 0,3 %, Gruppe der SE 2,3 ± 0,8 %. Die Analyse der IL-10-Produktion der Monozyten zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen: Kontrollgruppe 3,6 ± 0,7 %, Allergiker 3,6 ± 0,6 %, Gruppe der SE 5,7 ± 2,1 % (Figure 30).



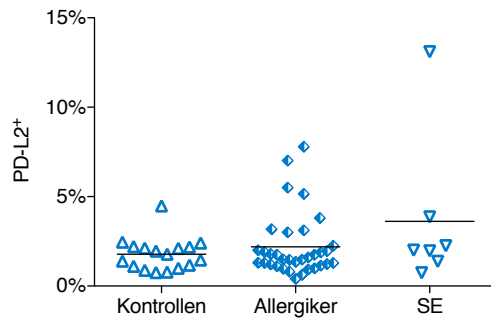
**Abbildung 31** Vergleich des prozentualen Anteils der IP-10 produzierenden Monozyten zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen der AR, der AA und der SE. Signifikant weniger Monozyten der Gruppe der AR ( $79,5 \pm 5,4\%$ ) produzierten IP-10 im Vergleich zu den Gruppen der AA ( $89,0 \pm 0,7\%$ ) und der SE ( $88,7 \pm 2,7\%$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,011$  beziehungsweise  $p = 0,048$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $84,0 \pm 3,6\%$ ) war der Unterschied nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,14$ ). Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.



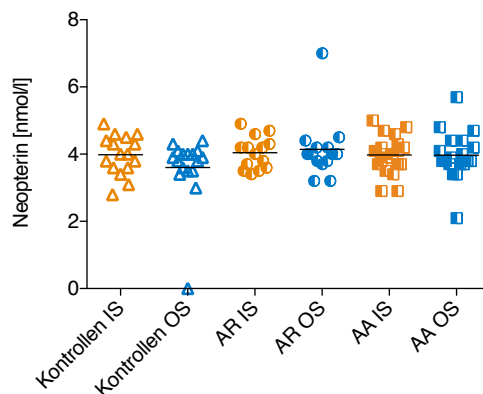
**Abbildung 32** Vergleich des prozentualen Anteils der PD-L1 produzierenden Monozyten zwischen der Kontrollgruppe, den Studienteilnehmern ohne AIT und mit AIT sowie der Gruppe der SE. In der Gruppe der Studienteilnehmer ohne AIT ( $2,2 \pm 0,2\%$ ) konnte eine signifikant erniedrigte Expression von PD-L1 auf Monozyten gegenüber sowohl der Gruppe mit AIT ( $3,0 \pm 0,6\%$ ) als auch der Gruppe der SE ( $3,4 \pm 0,5\%$ ) gemessen werden (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,047$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,01$ ). Gegenüber der Kontrollgruppe ( $2,7 \pm 0,3\%$ ) war der Unterschied nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,12$ ).

Der Vergleich der IP-10 Expression zeigte, dass die Monozyten der Gruppe der AR signifikant weniger IP-10 produzierten als die Monozyten der Gruppen der AA und der SE (Figure 31). Insbesondere die Untergruppe der AR ohne AIT ( $80,4 \pm 4,0\%$ ) zeigte eine signifikant erniedrigte IP-10 Expression gegenüber der Gruppe der AA ohne AIT ( $88,7 \pm 1,0\%$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,012$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $84,0 \pm 3,6\%$ ) war der Unterschied nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,057$ ).

Die Analyse des Liganden PD-L1 zeigte einen Unterschied in der Expression auf Monozyten in Abhängigkeit der Durchführung einer AIT. In der Untersuchungsgruppe ohne AIT konnte eine signifikant erniedrigte Expression gegenüber der Gruppe mit AIT gemessen werden. Außerdem zeigte die Gruppe der SE ebenfalls eine erhöhte PD-L1 Expression gegenüber den Studienteilnehmern ohne AIT (Figure 32).



**Abbildung 33** Vergleich des prozentualen Anteils der PD-L2 produzierenden Monozyten zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der Allergiker sowie der Gruppe der SE (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 34** Vergleich der Neopterin-Spiegel im Serumüberstand zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR und der AA zwischen der IS und der OS (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

Die Auswertung der Daten bezüglich einer Expression des Liganden PD-L2 auf den Monozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen: Kontrollgruppe  $1,8 \pm 0,2\%$ , Allergiker  $2,2 \pm 0,3\%$  und Gruppe der SE  $3,6 \pm 1,6\%$  (Figure 33).

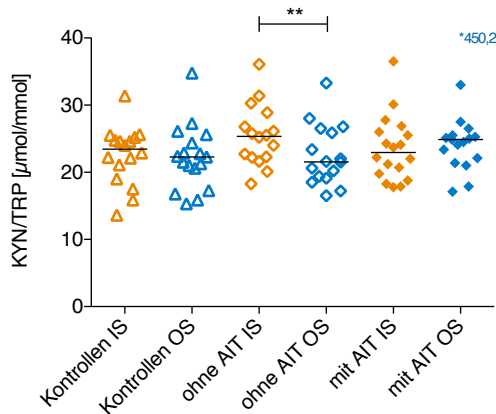
### 3.2.2. Serumüberstand

Diese Arbeit untersuchte den Serumüberstand der Studienteilnehmer bezüglich der Konzentration an Neopterin und Metaboliten des IDO-Stoffwechsels.

Neopterin entsteht als Abbauprodukt in Monozyten und Makrophagen und wird vermehrt unter oxidativem Stress der Zellen bei einer Aktivierung des Immunsystems gebildet. Somit dient Neopterin als Indikator für die Aktivität der Zellen im Rahmen der Inflammation. Die Analyse der Serumüberstände zeigte keinen signifikanten Unterschied der Neopterin-Spiegel in der IS ( $4,0 \pm 0,1$  nmol/l) im Vergleich zu den Werten der OS ( $3,8 \pm 0,1$  nmol/l). Außerdem wies der Vergleich der Untergruppen sowohl in der IS als auch in der OS keine signifikanten Unterschiede auf (Figure 34).

In der IS korrelierten die Neopterin-Spiegel im Serumüberstand weder mit dem Lebensalter





**Abbildung 35** Vergleich der IDO-Aktivität im Serumüberstand zwischen der Kontrollgruppe sowie den Studienteilnehmern ohne und mit AIT zwischen der IS und der OS. In den Serumüberständen der Gruppe ohne AIT zeigte sich eine erhöhte IDO-Aktivität in der IS ( $25,5 \pm 1,1 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) im Vergleich zur OS ( $22,5 \pm 1,1 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,004$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe mit AIT wies einen extremen Messwert von  $450,2 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.

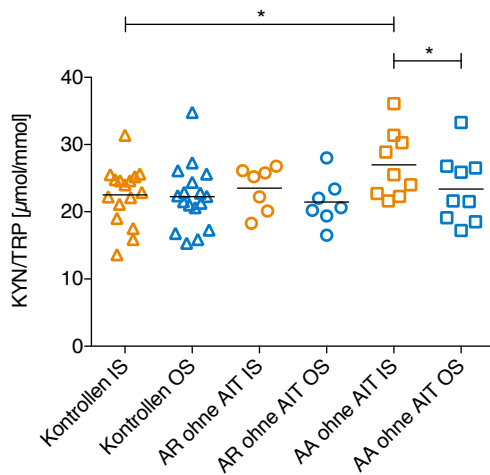
noch dem BMI (Spearman  $p > 0,05$ ). In der OS wurde eine negative Korrelation zwischen den Neopterin-Spiegeln und sowohl dem Lebensalter als auch dem BMI gemessen (Spearman  $r = -0,26$ ,  $p > 0,046$  beziehungsweise  $r = -0,29$   $p = 0,03$ ). Es konnte keine positive Korrelation zwischen dem Anteil an Monozyten der PBMC und den Neopterin-Spiegeln gemessen werden (Spearman  $r = 0,12$ ,  $p = 0,37$ ).

Das anti-inflammatorisch wirkende Enzym IDO wird in antigenpräsentierenden Zellen produziert und dient der Herabregulation von Entzündungsprozessen. Für die Beurteilung des IDO-Stoffwechsels wurde die Konzentration des Eduktes Tryptophan sowie des Produktes Kynurenin bestimmt. Aus dem Quotienten von Produkt- und Edukt-Konzentration wurde die Enzym-Aktivität berechnet.

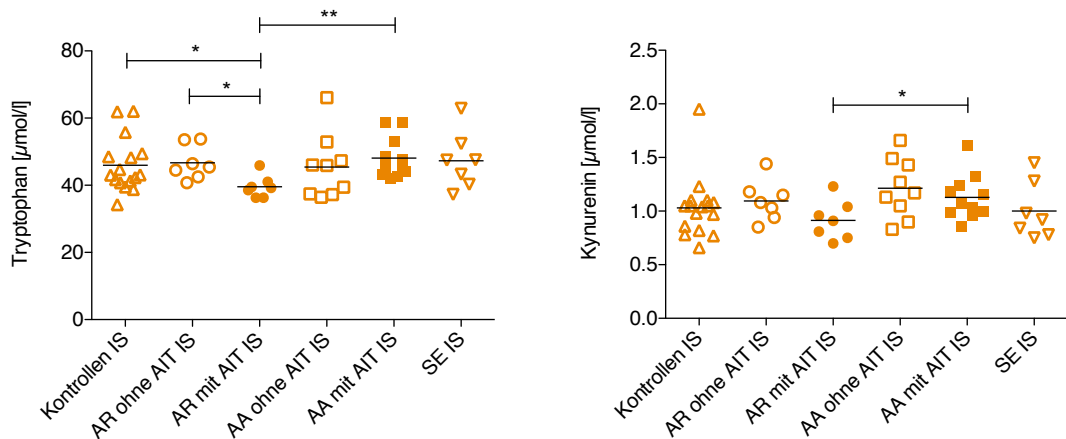
Die Messung der IDO-Aktivität zeigte in der IS im Vergleich zur OS einen signifikant erhöhten Wert im Serumüberstand der Studienteilnehmer ohne AIT (Figure 35). Vor allem in den Proben der Gruppe der AA ohne AIT wurde in der IS im Vergleich zur OS eine erhöhte IDO-Aktivität gemessen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die IDO-Aktivität der Gruppe AA ohne AIT in der IS signifikant erhöht (Figure 36).

Die Messung der Tryptophan-Spiegel im Serumüberstand zeigte signifikant niedrigere Werte in der Gruppe der AR mit AIT im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie der Gruppe der AR ohne AIT und der Gruppe der AA mit AIT (Figure 37a). Außerdem zeigte die Gruppe der AR mit AIT im Vergleich zur Gruppe der AA mit AIT ebenfalls erniedrigte Kynurenin-Spiegel im Serumüberstand (Figure 37b). In der OS wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

In der OS korrelierte die errechnete IDO-Aktivität im Serumüberstand weder mit dem Le-



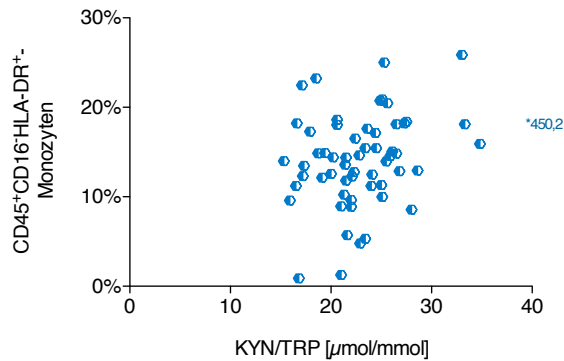
**Abbildung 36** Vergleich der IDO-Aktivität im Serumüberstand zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AA sowie der AR ohne AIT zwischen der IS und der OS. In den Serumüberständen der Gruppe AA ohne AIT wurde eine erhöhte IDO-Aktivität in der IS ( $27,0 \pm 1,7 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) im Vergleich zur OS ( $23,4 \pm 1,7 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) sowie im Vergleich zur Kontrollgruppe (IS:  $22,3 \pm 1,2 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) gemessen (gepaarter t-Test  $p = 0,039$  beziehungsweise ungepaarter t-Test  $p = 0,028$ ).



(a) Tryptophan

(b) Kynurenin

**Abbildung 37** Vergleich der Tryptophan-(a) und Kynurenin-Spiegel (b) im Serumüberstand in der IS zwischen den Untergruppen. Die Gruppe der AR mit AIT ( $39,5 \pm 1,2 \mu\text{mol}$ ) zeigte im Vergleich zur Gruppe der AA mit AIT ( $48,1 \pm 1,8 \mu\text{mol}$ ) und der AR ohne AIT ( $45,4 \pm 3,2 \mu\text{mol}$ ) sowie der Kontrollgruppe ( $46,0 \pm 2,0 \mu\text{mol}$ ) signifikant geringere Tryptophan-Werte (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,004$  beziehungsweise  $p = 0,015$  sowie  $p = 0,023$ ). Die Gruppe AR mit AIT ( $0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol}$ ) zeigte signifikant geringere Kynurenin-Werte im Vergleich zur Gruppe der AA mit AIT ( $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol}$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,04$ ).



**Abbildung 38** Korrelation der IDO-Aktivität (Kyn/Trp) mit dem Anteil an Monozyten der PBMC. Spearman  $r = 0,27, p = 0,042$ . Ein Studienteilnehmer wies einen extremen Messwert von  $450,2 \mu\text{mol/mmol}$  auf.

bensalter noch mit dem BMI (Spearman  $p > 0,05$ ). In der IS wurde keine Korrelation mit dem Lebensalter festgestellt. Es wurde eine positive Korrelation zwischen der IDO-Aktivität und dem BMI gemessen (Spearman  $r = 0,32, p = 0,016$ ). Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen dem Anteil an Monozyten der PBMC und der errechneten IDO-Aktivität gemessen werden (Spearman  $r = 0,27, p = 0,042$ , Figure 38). Es bestand eine positive Korrelation zwischen den Tryptophan- und Kynurenin-Spiegeln in der IS (Spearman  $r = 0,49, p < 0,001$ ) sowie der OS (Spearman  $r = 0,40, p = 0,002$ ).

### 3.3. Lokale Labordiagnostik

Auf lokaler Ebene analysierte diese Arbeit einerseits Makrophagen, welche aus den Sputumproben gewonnen wurden, und andererseits den Überstand der Sputumproben. Das Sputum diente als Abbild der lokalen Inflammation der Atemwege.

#### 3.3.1. Sputum-Qualität

Die Qualität der Sputumprobe ist essentiell für eine zuverlässige Messung der Sputumzellen. Sie wird einerseits durch die Zellzusammensetzung und andererseits durch die Höhe der Gesamtleukozytenzahl bestimmt. Außerdem sollte die Probe keine Fremdkörper oder sanguinöse Beimengungen enthalten.

Der zelluläre Anteil einer Sputumprobe setzt sich aus Leukozyten sowie squamösen Zellen zusammen. Je höher der Anteil an lebenden Leukozyten und je niedriger der Anteil toter Leukozyten sowie squamöser Zellen ist, desto höher kann die Qualität der Sputumprobe eingeordnet werden. Table 11 zeigt den Vergleich der Sputum-Zusammensetzung zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE in der IS. Table 12 zeigt den Vergleich der Sputumproben der OS. Hierbei wurden zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen gemessen (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ). Die Auswertung zeigte, dass die Proben der OS einen signifikant höheren prozentualen Anteil an toten Leukozyten und geringeren Anteil lebender Leukozyten aufwiesen (Kontrollgrup-

| Gruppe     | Lebende Leukozyten [%] | Tote Leukozyten [%] | Squamöse Zellen [%] |
|------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| Kontrollen | 94,3 (80,6–97,0)       | 3,7 (1,6–10,2)      | 2,5 (0,0–9,2)       |
| Allergiker | 92,4 (81,6–97,1)       | 3,9 (1,0–16,6)      | 2,1 (0,7–8,4)       |
| SE         | 93,7 (88,9–97,2)       | 3,5 (0,9–4,8)       | 3,0 (1,0–6,5)       |

**Tabelle 11** Vergleich der zellulären Sputum-Zusammensetzung in der Mikroskopie der IS zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE. Die Daten sind dargestellt als Median mit ihren Spannweiten.

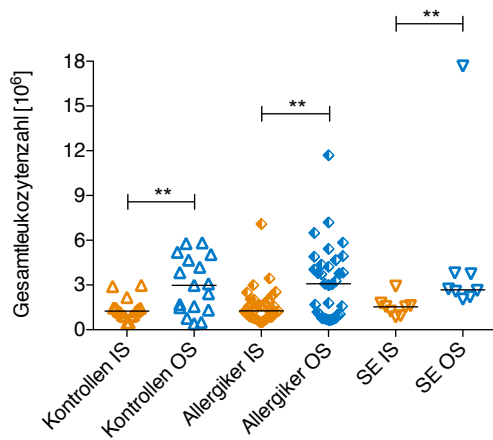
| Gruppe     | Lebende Leukozyten [%] | Tote Leukozyten [%] | Squamöse Zellen [%] |
|------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| Kontrollen | 88,8 (81,5–92,0)       | 8,2 (5,7–17,0)      | 2,3 (0,8–9,4)       |
| Allergiker | 88,8 (81,7–95,6)       | 6,6 (3,0–10,4)      | 3,8 (0,0–8,2)       |
| SE         | 87,3 (80,5–94,6)       | 8,4 (3,7–15,2)      | 3,8 (1,4–6,3)       |

**Tabelle 12** Vergleich der Sputum-Zusammensetzung in der Mikroskopie der OS zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE. Die Daten sind dargestellt als Median mit ihren Spannweiten.

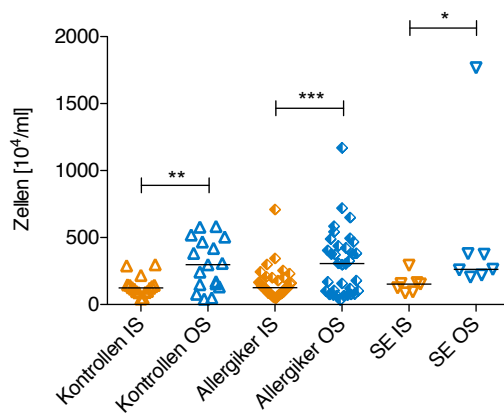
pe: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,006$ , Allergiker: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,0023$ , Gruppe der SE: gepaarter t-Test  $p = 0,013$ ).

Die Gesamtleukozytenzahl beeinflusst die Qualität des Sputums, da eine größere Anzahl an Zellen - durch eine größere Stichprobe - Messungen mit höherer Güte ermöglichen. Figure 39 stellt den Vergleich der Gesamtleukozytenzahl zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE in der IS sowie der OS dar. Hierbei wurden zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen gemessen (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ). Allerdings zeigte die Auswertung, dass alle Proben der OS im Vergleich zu den Proben der IS einen signifikant höheren Anteil an Gesamtleukozyten aufwiesen. Das Gewicht des selektierten Sputums betrug durchschnittlich in der IS  $1,4 \pm 1,1$  g und in der OS  $1,2 \pm 0,9$  g. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

Die Anzahl der Gesamtleukozyten pro Milliliter repräsentiert die Zelllast einer Probe. In der Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zelllast der einzelnen Gruppen sowohl in der IS als auch in der OS gemessen werden (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ). Die Zelllast war jedoch in der OS im Vergleich zur IS in allen drei Gruppen signifikant erhöht (Figure 40).



**Abbildung 39** Vergleich der Gesamtleukozytenzahl zwischen der IS und der OS im Sputum der Kontrollgruppe, der Gruppe der Allergiker und der Gruppe der SE. Alle drei Untergruppen wiesen eine signifikant höhere Gesamtleukozytenzahl im Sputum in der OS im Vergleich zur IS auf: Kontrollgruppe (IS:  $1,4 \pm 0,2 \cdot 10^6$  Zellen und OS:  $3,0 \pm 0,5 \cdot 10^6$  Zellen, gepaarter t-Test  $p = 0,005$ ), Allergiker (IS:  $1,6 \pm 0,2 \cdot 10^6$  Zellen und OS:  $3,2 \pm 0,4 \cdot 10^6$  Zellen, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,002$ ) und Gruppe der SE (IS:  $1,6 \pm 0,2 \cdot 10^6$  Zellen und OS:  $4,7 \pm 1,9 \cdot 10^6$  Zellen, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,008$ ). Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.



**Abbildung 40** Vergleich der Zelllast zwischen der IS und der OS im Sputum der Kontrollgruppe, der Gruppe der Allergiker und der Gruppe der SE. Alle drei Untergruppen wiesen in der OS signifikant mehr Zellen pro Milliliter im Sputum als in der IS auf: Kontrollgruppe (IS:  $138,2 \pm 18,3 \cdot 10^4$  Zellen/ml und OS:  $298,8 \pm 45,7 \cdot 10^4$  Zellen/ml, gepaarter t-Test  $p = 0,005$ ), Allergiker (IS:  $156,3 \pm 20,3 \cdot 10^4$  Zellen/ml und OS:  $312,1 \pm 42,2 \cdot 10^4$  Zellen/ml, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,001$ ) und Gruppe der SE (IS:  $152,4 \pm 25,9 \cdot 10^4$  Zellen/ml und OS:  $495,5 \pm 213,6 \cdot 10^4$  Zellen/ml, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,016$ ). Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.

| Gruppe     | Makrophagen [%]   | Neutrophile Granulozyten [%] | Lymphozyten [%] | Eosinophile Granulozyten [%] |
|------------|-------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Kontrollen | 82,5 (47,0–99,6)  | 16,5 (0,4–52,3)              | 0,9 (0,0–2,0)   | 0,1 (0,0–0,5)                |
| Allergiker | 80,0 (31,8–100,0) | 16,7 (0,0–62,5)              | 1,6 (0,0–15,5)  | 1,8 (0,0–20,3)               |
| SE         | 81,7 (59,0–99,5)  | 16,7 (0,5–39,5)              | 1,6 (0,0–3,3)   | 0,04 (0,0–0,3)               |

**Tabelle 13** Vergleich der Sputum-Zytologie der IS zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE. Die Daten sind dargestellt als Median mit ihren Spannweiten.

| Gruppe     | Makrophagen [%]   | Neutrophile Granulozyten [%] | Lymphozyten [%] | Eosinophile Granulozyten [%] |
|------------|-------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Kontrollen | 86,5 (40,0–100,0) | 12,8 (0,0–59,8)              | 0,6 (0,0–2,3)   | 0,1 (0,0–0,8)                |
| Allergiker | 91,2 (47,0–100,0) | 8,1 (0,0–49,5)               | 0,6 (0,0–3,0)   | 0,1 (0,0–1,3)                |
| SE         | 86,6 (31,3–100,0) | 13,0 (0,0–68,5)              | 0,4 (0,0–1,8)   | 0,04 (0,0–0,3)               |

**Tabelle 14** Vergleich der Sputum-Zytologie der OS zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern und der Gruppe der SE. Die Daten sind dargestellt als Median mit ihren Spannweiten.

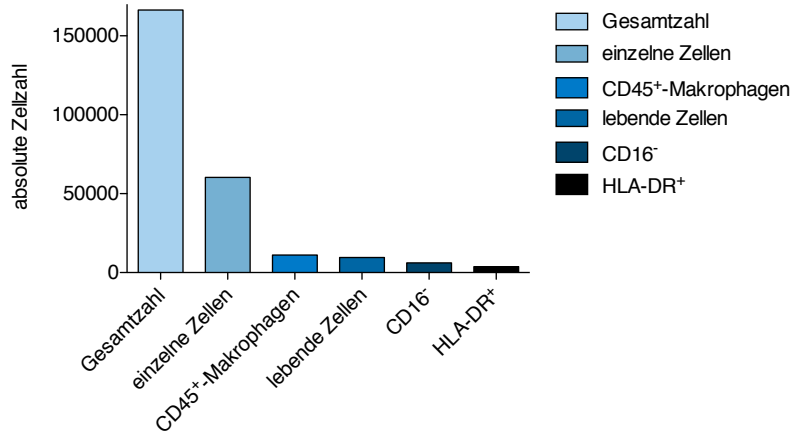
### 3.3.2. Zytologie

Für die Evaluation der Sputum-Zellanalyse durch die Durchflusszytometrie erfolgte zusätzlich eine Anfertigung von Zytopspinpräparaten. Die Zellzählung der Zytopspinpräparate zeigte einen Makrophagen-Anteil von 80,9 % in der IS und 89,3 % in der OS. Hierbei ergaben sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, den Allergikern sowie der Gruppe der SE. In der IS zeigten Allergiker im Vergleich zur Kontrollgruppe einen erhöhten Anteil an eosinophilen Granulozyten. In Table 13 ist die vollständige Leukozyten-Differentialzellzählung der IS dargestellt. Table 14 zeigt die Verteilung der OS.

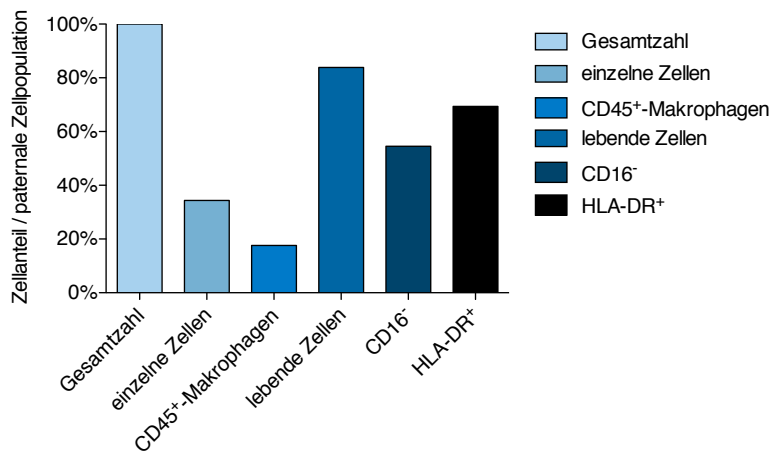
### 3.3.3. Durchflusszytometrie

Im Rahmen der Gating-Strategie der Durchflusszytometrie-Analyse wurden die Makrophagen von den anderen Sputumzellen getrennt. Hierbei wurden die Makrophagen mit Hilfe folgender drei Oberflächenmoleküle ausgewählt: CD45<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> und HLA-DR<sup>+</sup>. Figure 41 zeigt die durchschnittlich absoluten Zellzahlen der Eingrenzungsschritte und Figure 42 die relativen Zellzahlen in Bezug zur höheren Hierarchiestufe der verschiedenen Eingrenzungsschritte („Gating“). Im Mittel wurden 3638 CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen analysiert.

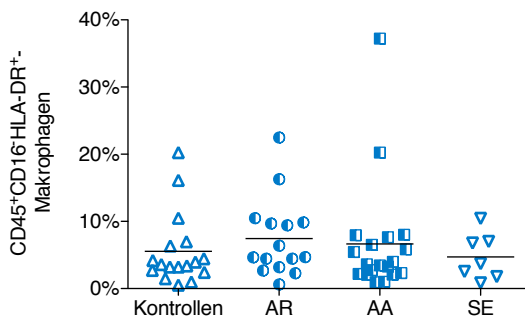
Der prozentuale Anteil der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-Makrophagen in Bezug zu den Gesamt-Makrophagen betrug durchschnittlich  $54,5 \pm 0,3\%$ . Die Analyse der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen in Bezug zu CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-Makrophagen zeigte, dass der Anteil an CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen durchschnittlich  $69,4 \pm 0,3\%$  betrug. Figure 43 zeigt den prozentualen Anteil der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen in Bezug zu den gesamten Sputumzellen, welcher im Durchschnitt  $6,10 \pm 0,06\%$  betrug. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen. Auch die Analyse der Untergruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).



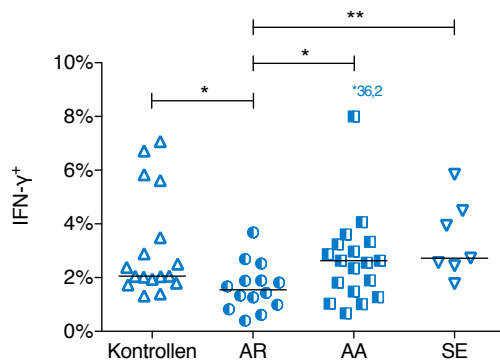
**Abbildung 41** Darstellung der durchschnittlichen absoluten Zellzahlen der einzelnen Eingrenzungsschritte im Gating-Prozess der Makrophagen im Sputum.



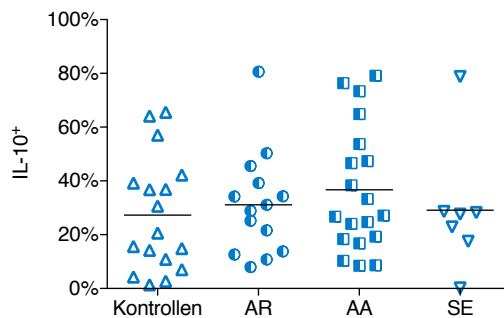
**Abbildung 42** Darstellung der durchschnittlich relativen Zellzahlen der einzelnen Eingrenzungsschritte im Gating-Prozess der Makrophagen im Sputum in Bezug zur höheren Hierarchiestufe.



**Abbildung 43** Vergleich des prozentualen Anteils an CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen in der Sputumzell-Population zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der AA sowie der SE (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 44** Vergleich des prozentualen Anteils der IFN- $\gamma$ -produzierenden Makrophagen zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der AA und der Gruppe der SE. In der Gruppe der AR ( $1,6 \pm 0,2\%$ ) wurden im Vergleich zur Gruppe der AA ( $4,4 \pm 1,8\%$ ) und der Gruppe der SE ( $3,4 \pm 0,5\%$ ) sowie der Kontrollgruppe ( $3,1 \pm 0,5\%$ ) signifikant weniger IFN- $\gamma$ -produzierende Makrophagen gemessen (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,024$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,007$  sowie ungepaarter t-Test  $p = 0,014$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe der AA wies einen extremen Messwert von 36,2% auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.



**Abbildung 45** Vergleich des prozentualen Anteils der IL-10 produzierenden Makrophagen zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der Gruppe der AA und der Gruppe der SE (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

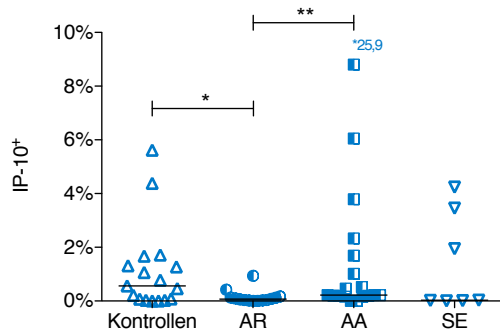
Die CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen wurden für die weitere Analyse auf die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10 und IP-10 untersucht. Außerdem wurde die Expression der Transmembranliganden PD-L1 sowie PD-L2 ermittelt. Die CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen werden im Folgenden mit Rücksicht auf die Lesbarkeit vereinfachend als Makrophagen bezeichnet.

Die Analyse der Produktion von IFN- $\gamma$  zeigte, dass in der Gruppe der AR signifikant weniger Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Gruppe der AA sowie der Gruppe der SE (Figure 44) das Zytokin exprimierten. Im Vergleich der Studienteilnehmer mit und ohne AIT wurde kein signifikanter Unterschied gemessen (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

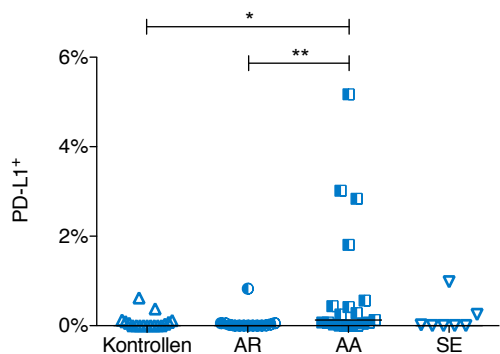
Die Auswertung der IL-10 Produktion der Makrophagen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen: Kontrollgruppe  $27,3 \pm 5,2\%$ , Gruppe der AR  $31,2 \pm 5,2\%$ , Gruppe der AA  $36,7 \pm 5,4\%$  und Gruppe der SE  $29,1 \pm 9,1\%$  (Figure 45).

In der Analyse der Expression von IP-10 zeigte sich eine signifikant erniedrigte Expression





**Abbildung 46** Vergleich des prozentualen Anteils der IP-10 produzierenden Makrophagen zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der Gruppe der AA und der Gruppe der SE. Eine signifikant erniedrigte Produktion von IP-10 zeigten Makrophagen der Gruppe der AR ( $0,2 \pm 0,1\%$ ) im Vergleich zur Gruppe der AA ( $2,7 \pm 1,4\%$ ) sowie der Kontrollgruppe ( $1,1 \pm 0,4\%$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,002$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,032$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe der AA wies einen extremen Messwert von 25,9% auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.

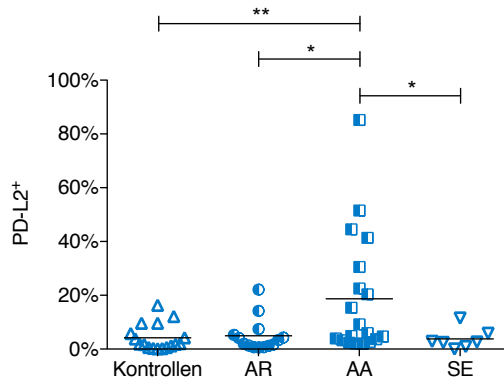


**Abbildung 47** Vergleich des prozentualen Anteils der PD-L1-produzierenden Makrophagen zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der Gruppe der AA und der Gruppe der SE. Eine signifikant erhöhte PD-L1-Expression der Makrophagen wurde in der Gruppe der AA ( $0,8 \pm 0,3\%$ ) im Vergleich zur Gruppe der AR ( $0,1 \pm 0,1\%$ ) und der Kontrollgruppe ( $0,10 \pm 0,04\%$ ) gemessen (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,006$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,026$ ). Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.

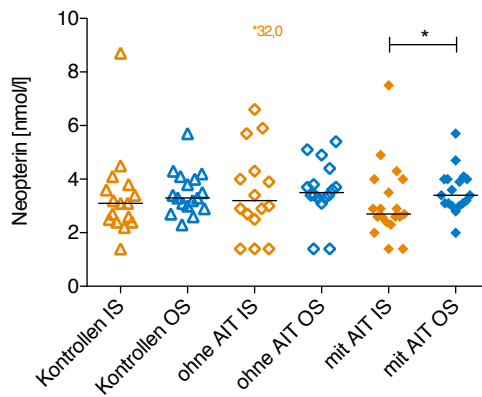
von IP-10 durch Makrophagen der Gruppe der AR im Vergleich zur Gruppe der AA sowie der Kontrollgruppe (Figure 46).

Der Vergleich der Expression von PD-L1 zeigte, dass signifikant mehr Makrophagen der Gruppe der AA im Vergleich zur Gruppe der AR sowie der Kontrollgruppe PD-L1 exprimiert wurden (Figure 47). Die Analyse der Untergruppen zeigte, dass insbesondere die Gruppe der AA ohne AIT ( $1,0 \pm 0,6\%$ ) vermehrt PD-L1 aufwies im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,10 \pm 0,04\%$ ) (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,026$ ).

Die Auswertung der Daten bezüglich der Bildung von PD-L2 ergab eine signifikant erhöhte Expression von PD-L2 der Makrophagen der Gruppe der AA im Vergleich zu den anderen Gruppen (Figure 48). Die Analyse der Untergruppen zeigte, dass insbesondere die Gruppe der AA mit AIT ( $21,1 \pm 8,4\%$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $4,2 \pm 1,2\%$ ) eine erhöhte PD-L2-Bildung aufwies (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,009$ ).



**Abbildung 48** Vergleich des prozentualen Anteils der PD-L2-produzierenden Makrophagen zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR, der Gruppe der AA und der Gruppe der SE. Eine signifikant erhöhte Expression von PD-L2 wurde in der Gruppe der AA ( $18,7 \pm 5,2\%$ ) im Vergleich zur Gruppe der AR ( $4,9 \pm 1,6\%$ ), der Gruppe der SE ( $3,8 \pm 1,5\%$ ) und der Kontrollgruppe ( $4,2 \pm 1,2\%$ ) gemessen (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,01$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,04$  und Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,003$ ).

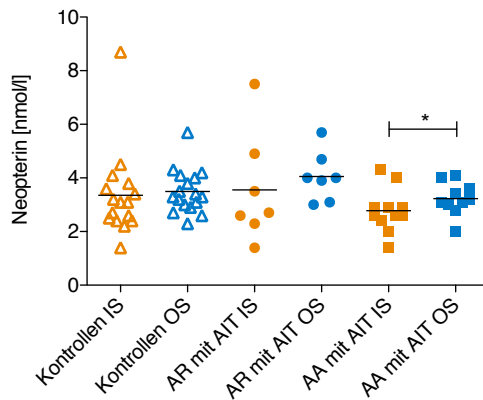


**Abbildung 49** Vergleich des Neopterin-Spiegels im Sputumüberstand zwischen der IS und der OS zwischen der Kontrollgruppe sowie den Studienteilnehmenden ohne und mit AIT. In den Sputumüberständen der Gruppe mit AIT zeigte sich eine erhöhte Neopterin-Produktion in der OS ( $3,6 \pm 0,2$  nmol/l) im Vergleich zur IS ( $3,1 \pm 0,3$  nmol/l) (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,024$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe ohne AIT wies in der IS einen extremen Messwert von 32,0 nmol/l auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.

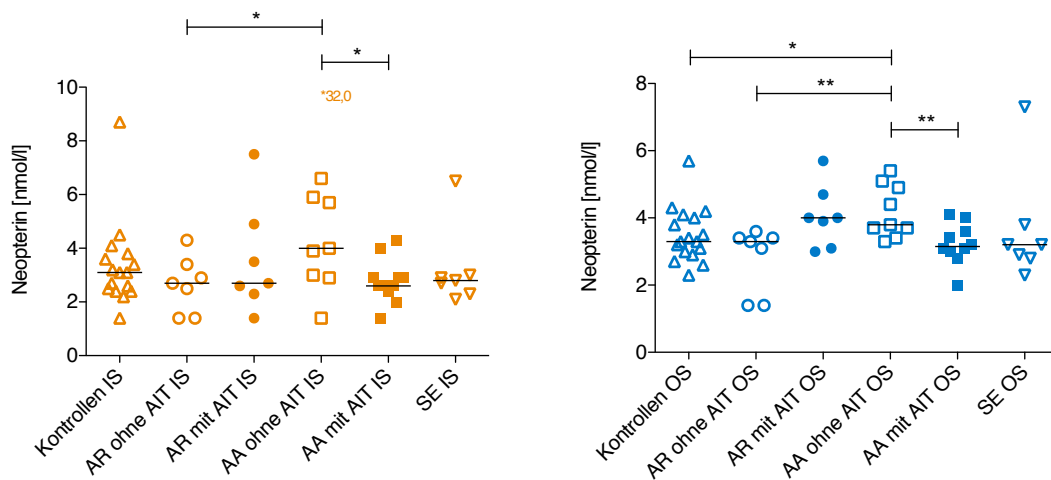
### 3.3.4. Sputumüberstand

Diese Arbeit untersuchte den Sputumüberstand der Studienteilnehmer bezüglich der Konzentration an Neopterin und Metaboliten des IDO-Stoffwechsels.

Der Vergleich der Neopterin-Spiegel aller Studienteilnehmer zeigte signifikant höhere Werte in der OS (Median: 3,4 nmol/l) im Vergleich zur IS (Median: 2,9 nmol/l) (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,038$ ). In der Analyse der Gruppen wurde in der Gruppe der Studienteilnehmer mit AIT ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der IS und der OS gemessen (Figure 49). Im Vergleich der Untergruppen zeigte die Gruppe der AA mit AIT signifikant erhöhte Neopterin-Spiegel in der OS im Vergleich zur IS (Figure 50). Die weitere Analyse der Untergruppen zeigte, dass die Gruppe der AA ohne AIT sowohl in der IS als auch in der OS die höchsten Neopterin-Spiegel aufwies (Figure 51).



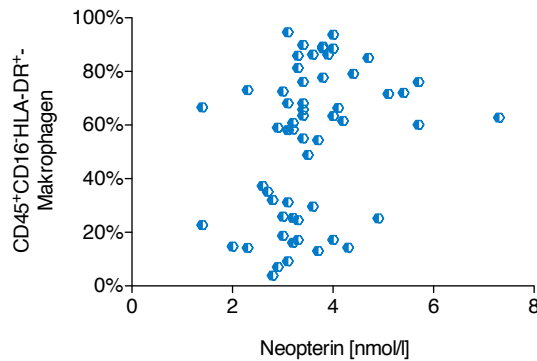
**Abbildung 50** Vergleich des Neopterin-Spiegels im Sputumüberstand zwischen der IS und der OS zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR und der AA mit AIT. In den Sputumüberständen der Gruppe der AA mit AIT zeigt sich eine signifikant erhöhte Neopterin-Produktion in der OS ( $3,2 \pm 0,2$  nmol/l) im Vergleich zur IS ( $2,8 \pm 0,2$  nmol/l) (gepaarter t-Test  $p = 0,042$ ).



(a) In-Season

(b) Off-Season

**Abbildung 51** Vergleich des Neopterin-Spiegels im Sputumüberstand in der IS (a) und OS (b) zwischen den Untergruppen. In den Sputumüberständen der IS wurde eine signifikant erhöhte Neopterin-Produktion in der Gruppe der AA ohne AIT ( $7,3 \pm 3,1$  nmol/l) im Vergleich zur Gruppe der AA mit AIT ( $2,8 \pm 0,2$  nmol/l) und der Gruppe der AR ohne AIT ( $2,7 \pm 0,4$  nmol/l) gemessen (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,024$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,049$ ). Der Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ( $3,4 \pm 0,4$  nmol/l) war nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,10$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe der AA ohne AIT wies in der IS einen extremen Messwert von 32,0 nmol/l auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben. In den Sputumüberständen der OS zeigte sich eine signifikant erhöhte Neopterin-Produktion in der Gruppe der AA ohne AIT ( $4,2 \pm 0,3$  nmol/l) im Vergleich zur Gruppe der AA mit AIT ( $3,2 \pm 0,2$  nmol/l), der Gruppe der AR ohne AIT ( $2,8 \pm 0,4$  nmol/l) sowie der Kontrollgruppe ( $3,5 \pm 0,2$  nmol/l) (ungepaarter t-Test  $p = 0,008$  beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,007$  sowie Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,04$ ).



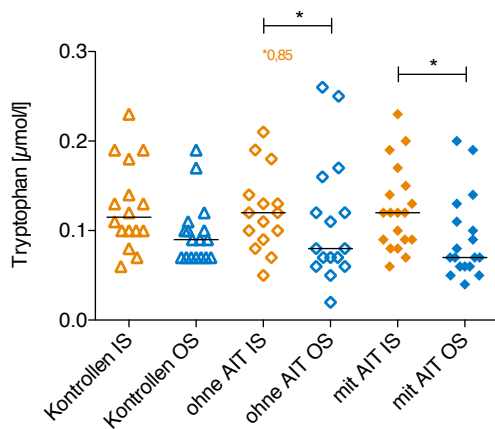
**Abbildung 52** Korrelation der Neopterin-Spiegel mit dem Anteil an CD16<sup>+</sup>-Makrophagen der Sputumzellen. Spearman  $r = 0,38, p = 0,004$ .

In der IS sowie der OS korrelierten die Neopterin-Spiegel im Sputumüberstand weder mit dem Lebensalter noch dem BMI (Spearman  $p > 0,05$ ). Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Anteil an CD16<sup>+</sup>-Makrophagen der Sputumzellen und den Neopterin-Spiegeln gemessen (Spearman  $r = 0,38, p = 0,004$ , Figure 52).

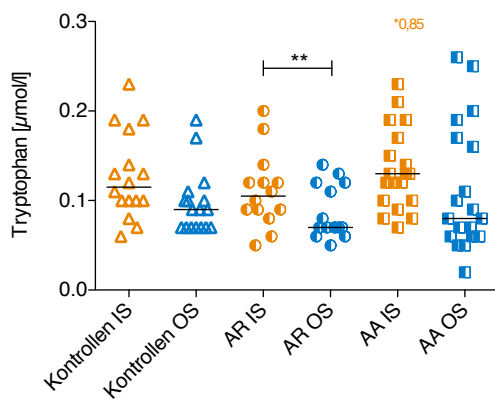
Für die Beurteilung des IDO-Stoffwechsels wurde die Konzentration des Eduktes Tryptophan sowie des Produktes Kynurenin bestimmt. Eine Kynurenin Messung im Sputumüberstand war nur bei zwei Proben möglich. Die Probe eines Kontroll-Studienteilnehmers ( $879,9 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) wies einen vierfach erhöhten Kyn/ Try-Quotienten im Vergleich zur Probe eines Studienteilnehmers der Gruppe AA ohne AIT ( $159,9 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) auf.

Der Vergleich aller Tryptophan-Werte zeigte durchschnittlich signifikant erhöhte Tryptophan-Spiegel im Sputumüberstand der IS ( $0,14 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) im Vergleich zur OS ( $0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,005$ ). In der Analyse der einzelnen Gruppen wurde dieser Unterschied in der Gruppe der Allergiker mit und ohne AIT (Figure 53) sowie der Gruppe der AR (Figure 54) gemessen. Die Auswertung der Untergruppen zeigte sowohl der IS als auch der OS keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis Test  $p > 0,05$ ).

Sowohl in der IS als auch in der OS korrelierten die Tryptophan-Spiegel im Sputumüberstand weder mit dem Lebensalter noch dem BMI (Spearman  $p > 0,05$ ). Es konnte keine Korrelation zwischen dem Anteil an Makrophagen der Sputumzellen und den Tryptophan-Spiegeln gemessen werden (Spearman  $r = -0,11, p = 0,43$ ). Die Tryptophan-Spiegel der Sputumüberstände korrelierten positiv mit den Neopterin-Spiegeln der Sputumüberstände in der IS (Spearman  $r = 0,33, p = 0,008$ ).



**Abbildung 53** Vergleich des Tryptophan-Spiegels im Sputumüberstand zwischen der IS und der OS zwischen der Kontrollgruppe und den Studienteilnehmenden ohne und mit AIT. In den Sputumüberständen der Gruppe ohne AIT (IS:  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{mol}$  und OS:  $0,11 \pm 0,02 \mu\text{mol}$ ) und mit AIT (IS:  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol}$  und OS:  $0,09 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) zeigte sich eine erhöhte Tryptophan-Produktion in der IS im Vergleich zur OS (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,044$  beziehungsweise Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,012$ ). In der der Kontrollgruppe war der Unterschied zwischen der IS ( $0,13 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) und der OS ( $0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,088$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe ohne AIT wies in der IS einen extremen Messwert von  $0,85 \mu\text{mol/l}$  auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.



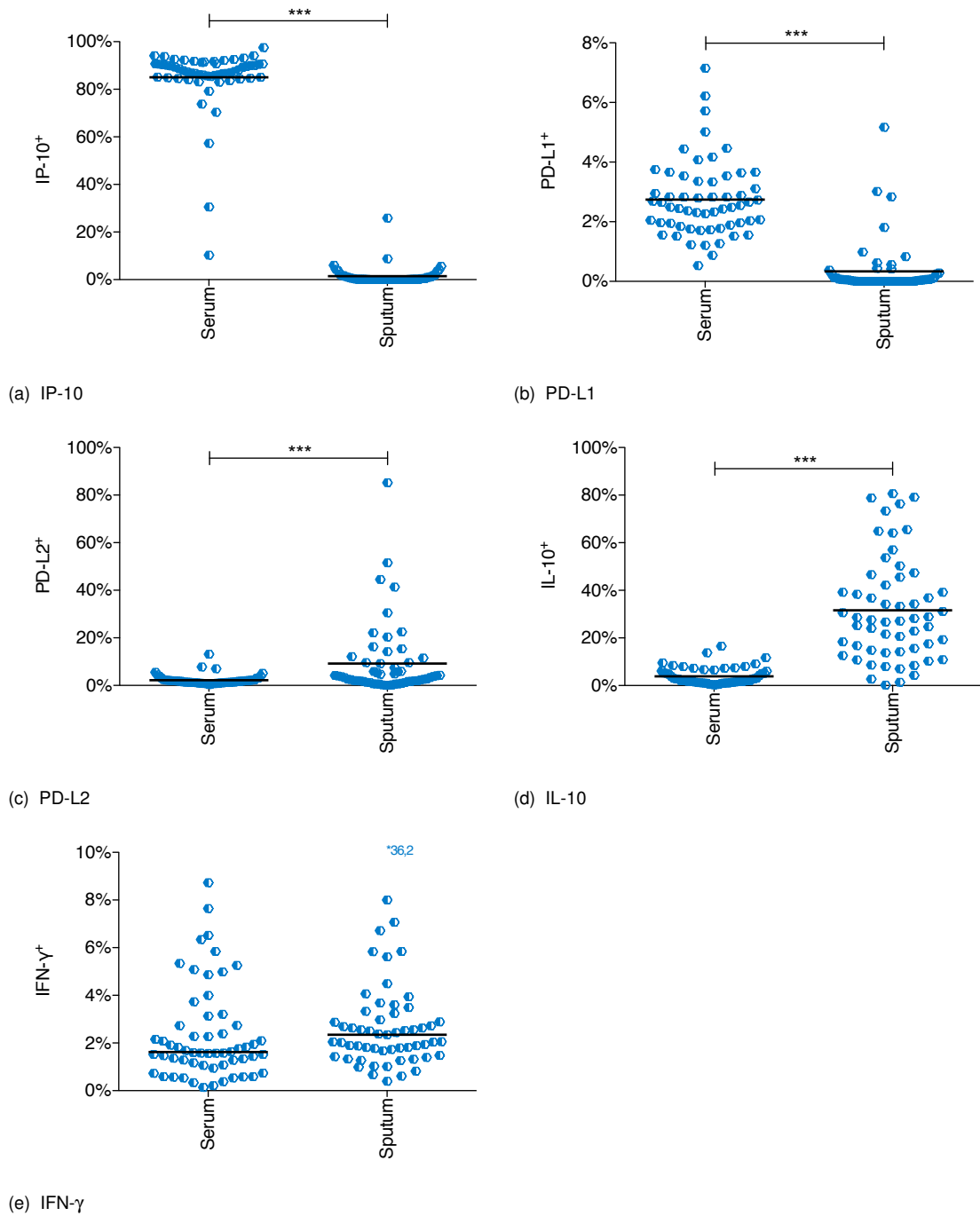
**Abbildung 54** Vergleich des Tryptophan-Spiegels im Sputumüberstand zwischen der IS und der OS zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der AR und der Gruppe der AA. In den Sputumüberständen der Gruppe der AR zeigte sich eine erhöhte Tryptophan-Produktion in der IS ( $0,11 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) im Vergleich zur OS ( $0,09 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ ) (gepaarter t-Test  $p = 0,004$ ). In der Gruppe der AA war der Unterschied zwischen der Werten der IS ( $0,17 \pm 0,04 \mu\text{mol}$ ) und der OS ( $0,11 \pm 0,02 \mu\text{mol}$ ) nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,051$ ). Ein Studienteilnehmer aus der Gruppe der AA wies in der IS einen extremen Messwert von  $0,85 \mu\text{mol/l}$  auf. Jeweils der Median einer Gruppe ist hervorgehoben.

### 3.4. Vergleich der Ebenen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blut-Monozyten und Atemwegs-Makrophagen im Kontext allergischer Erkrankungen analysiert. Table 15 und Figure 55 zeigen den Vergleich des Expressionsmusters der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen im Blut (Monozyten) mit den Sputumzellen (Makrophagen). Hierbei wurde eine signifikant erhöhte Expression von IP-10 und PD-L1 der Monozyten im Vergleich zu den Makrophagen gemessen. Andererseits zeigte die Analyse eine signifikant erhöhte Expression von IL-10 sowie PD-L2 der Makrophagen im Gegensatz zu den Monozyten. Die IFN- $\gamma$  Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede.

| CD45 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> | IFN- $\gamma$ [%] | IP-10 [%]           | PD-L1 [%]         | PD-L2 [%]         | IL-10 [%]          |
|---|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Monozyten   | 1,6<br>(0,1–8,7)  | 87,7<br>(10,3–97,5) | 2,5<br>(0,5–7,2)  | 1,8<br>(0,4–13,1) | 2,1<br>(0,3–16,5)  |
| Makrophagen   | 2,4<br>(0,4–36,2) | 0,2<br>(0,0–25,9)   | 0,03<br>(0,0–5,2) | 3,7<br>(0,1–85,2) | 27,6<br>(0,2–80,6) |
| p-Wert  | 0,32              | <0,001              | <0,001            | <0,001            | <0,001             |

**Tabelle 15** Vergleich des Zytokinexpressionsmusters der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Blut-Monozyten und Atemwegs-Makrophagen. Die Daten wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen und sind dargestellt als Median mit ihren Spannweiten.



**Abbildung 55** Vergleich des Zytokinexpressionsmusters der  $CD45^+CD16^-HLA-DR^+$ -Blut-Monozyten und Atemwegs-Makrophagen. Ein Studienteilnehmer wies einen extremen Messwert von 36,2% IFN- $\gamma$  im Sputum auf. In dem IFN- $\gamma$ -Graphen ist der Median einer Gruppe hervorgehoben.

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie ist es, Biomarker im Bereich der Allergologie zu identifizieren, die das Entzündungsgeschehen beeinflussen. Hierfür wurden Allergiker und gesunde Kontrollen untersucht, wobei der Fokus auf der Gräserpollenallergie lag. Die Ergebnisse zeigen, dass 1) Studienteilnehmer mit AIT im Vergleich zu den Studienteilnehmern ohne AIT weniger Belastung durch Symptome der Rhinokonjunktivitis aufwiesen, und 2) die Gruppe der AA mit AIT im Vergleich zur Gruppe der AA ohne AIT eine bessere Kontrolle des allergischen Asthmas sowie eine erhöhte Lebensqualität angaben. Die Untersuchungen der Blut- und Sputumproben ergaben, dass 3) die Monozyten der Allergiker ohne AIT weniger PD-L1 exprimierten und 4) sowohl die Monozyten als auch die Makrophagen der Gruppe der AA mehr IP-10 im Vergleich zu den Zellen der Gruppe der AR produzierten. Außerdem wiesen 5) die Makrophagen der Gruppe der AA im Vergleich zur Gruppe der AR sowie der Kontrollgruppe eine erhöhte PD-L1 sowie PD-L2 Expression auf. Die Analyse der Überstände zeigte 6) eine erniedrigteIDO-Aktivität im Serum in der Gruppe der AA mit Immuntherapie sowie erniedrigte Neopterin-Spiegel im Sputum im Vergleich zu der Gruppe mit Immuntherapie.

Die Diskussion ist in drei Abschnitte gegliedert. Zunächst erfolgt die Einordnung der Ergebnisse, wobei die Punkte 1) und 2) im Abschnitt zur allergologischen Diagnostik (4.1.1) erörtert werden. Anschließend werden die Punkte 3), 4) und 6) im Abschnitt zur systemischen Ebene (4.1.2) und die Punkte 4), 5) und 6) im Abschnitt zur lokalen Ebene (4.1.3) eingeordnet. Nach der Einordnung der Ergebnisse werden die Limitationen der Studie aufgezeigt. Abschließend wird die Bedeutung für die klinische Praxis diskutiert.

### 4.1. Ergebniseinordnung

#### 4.1.1. Allergologische Diagnostik

Die allergologische Diagnostik ist ein Maßstab für den Wirkungsgrad der allergenspezifischen Immuntherapie. Diese Werte verdeutlichen zudem die Unterschiede zwischen der Gruppe der AA und der Gruppe der AR. Im Folgenden wird zunächst die Symptombelastung, anschließend die asthmatischen Beschwerden und zuletzt die IgE-Diagnostik bewertet.

mRQLQ-Fragebögen lassen Rückschlüsse auf die Relevanz der Symptome für die Patienten zu. Die Symptombelastung wurde von allen Allergikern verstärkt in der Untersuchung während des Pollenfluges (IS) angegeben. Dies bestätigt den saisonalen Charakter der Hauptallergene – Gräserpollen (g6) – der Studienteilnehmer. Die Gruppe der SE gab im Vergleich zur Kontrollgruppe keine verstärkte Symptombelastung an, weshalb diese Studienteilnehmer als eigene Gruppe eingeordnet wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Studienteilnehmer ohne AIT im Vergleich zu den therapierten Patienten in der IS verstärkt an allergischen Symptomen litten. Diese Daten sprechen für die Wirksamkeit der AIT hinsichtlich einer reduzier-



ten Symptombelastung (Filanowicz, Szykiewicz, Cegła & Bartuzi, 2016). Die Gruppe der AA ohne AIT gab auch außerhalb der Allergiesaison eine höhere Symptombelastung als die Kontrollgruppe an. Eine Ursache kann eine Ko-Sensibilisierung mit Hausstaubmilben sein, deren Symptome auch in der Winterzeit verstärkt angegeben wurden (Y. Wang et al., 2014). Des Weiteren können Atemwegsinfektionen, die im Winter gehäuft auftreten, sowie eine Kaltluftexposition allergenunabhängig zu asthmatischen Beschwerden führen (Buhl et al., 2017).

Die Analyse von Lungenfunktion, ACT- sowie PSQ-Fragebogen diente der Einordnung der asthmatischen Beschwerden der Studienteilnehmer. Die Volumenmessungen der Lungenfunktion zeigen, dass die Gruppe der AA in beiden Untersuchungen im Vergleich zu der Gruppe der AR einen reduzierten Tiffeneau-Wert erreichte. Dieses Ergebnis legt eine korrekte Klassifizierung der Studienteilnehmer mit Asthma nahe. Der Tiffeneau-Wert der Kontrollgruppe war im Vergleich zu der Gruppe der AA nicht signifikant erhöht. Dies kann mit unbekanntem Atemwegserkrankungen von Studienteilnehmern der Kontrollgruppe zusammenhängen. Die Gruppe der AA mit AIT zeigte im Vergleich zu der Gruppe der AA ohne AIT in der Auswertung des ACT-Fragebogens ein besser kontrolliertes Asthma während der Allergiesaison. Diese Gruppe der AA ohne AIT gab im Vergleich zu der Kontrollgruppe im PSQ-Fragebogen in der IS mehr Belastungen im Alltag an. Diese Daten deuten auf eine Verbesserung der asthmatischen Symptomatik und der Lebensqualität durch die AIT hin. Eine Metaanalyse von Dhimi et al. (2017) kam ebenfalls zu dem Schluss, dass die Durchführung einer AIT – in Form der SCIT für mindestens 1 Jahr – zu einer Minderung der akuten Symptome führt. Sie konnte jedoch keine konkreten Auswirkungen auf die längerfristige Asthma-Kontrolle messen. Hierfür wurden die Daten aus 98 Studien verschiedener AIT-Typen bei Patienten mit allergischem Asthma analysiert. Eine Verbesserung der Lebensqualität, ermittelt durch asthmaspezifische Fragebögen, wurde bei Patienten mit AIT konkordant zu den Daten dieser Studie nachgewiesen. Eine Zunahme der obstruktiven Lungenfunktionsparameter durch die AIT konnte nur in der Patientengruppe mit primär bereits reduzierter FEV<sub>1</sub> von 25–75 % gezeigt werden. In dieser Studie wurden keine Patienten mit einer Lungenfunktion in diesem Bereich eingeschlossen.

Die Auswertung der IgE-Werte zeigte auf der einen Seite Zusammenhänge mit der allergischen Erkrankung, auf der anderen Seite konnte jedoch keine Veränderung durch die AIT gemessen werden. Die IgE-Werte der Allergiker waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Gruppe der AA wies im Vergleich zu der Gruppe der AR einen durchschnittlich höheren Gesamt-IgE-Wert auf. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die erhöhten IgE-Werte in der Gruppe der AA sprechen für die allergische Genese des Asthmas der Studienteilnehmer. Siroux et al. (2018) konnten ebenfalls erhöhte Werte in der Gruppe der Studienteilnehmer mit AA im Vergleich zu der Gruppe mit AR messen. Hierzu wurden die IgE-Spiegel von 1626 Studienteilnehmern in Frankreich und Schweden untersucht. Des Weiteren zeigt die Auswertung, dass sowohl das Gesamt-IgE-Niveau als auch die gräser-spezifischen IgE-Werte mit der Symptombelastung des mRQLQ-Fragebogens korrelieren. Dieses Ergebnis steht jedoch in Kontrast zur Gruppe der SE. Diese Studienteilnehmer gaben im

Vergleich zur Kontrollgruppe trotz erhöhter IgE-Werte keine erhöhten Symptombeschwerden an. Dies wiederum steht in Einklang mit einer Studie von Ballardini et al. (2016), die gezeigt hat, dass ein Viertel der sensibilisierten Kinder bis zum Alter von 16 Jahren keine allergische Symptome entwickelt (n=2600). Diese Sondergruppe der SE bestärkt die These, dass neben der Entwicklung einer Sensibilisierung weitere genetische Faktoren und Umweltbedingungen notwendig sind, um eine Erkrankung aus dem allergischen Formenkreis zu entwickeln. Hingegen zeigte die Analyse des Einflusses der AIT keine Unterschiede bezüglich der IgE-Werte zwischen den Gruppen. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass durch die AIT vermehrt spezifische IgG4-Antikörper gebildet werden, die mit den IgE-Antikörpern um Bindungsstellen konkurrieren und auf diese Weise die allergische Reaktion abschwächen (Groh et al., 2017). Bezüglich der Durchführung einer AIT zeigten Ciprandi, Silvestri und Sivestri (2014), dass der spezifische IgE-Wert als prognostischer Marker genutzt werden kann, um zu Beginn der AIT den Erfolg abschätzen zu können. Vor allem Patienten mit erhöhten IgE-Spiegeln profitierten von einer AIT.

Schlussfolgernd zeigt die Auswertung der allergologischen Diagnostik im Einklang mit der Literatur, dass die Immuntherapie bei Allergikern zu einer Reduktion der Symptombelastung führt. Asthmatiker mit erfolgreicher AIT wiesen ein besser kontrolliertes Krankheitsbild auf. Das IgE-Niveau sowie der Tiffeneau-Wert in der Lungenfunktion zeigten sich unbeeinflusst durch die AIT.

#### **4.1.2. Systemische Ebene**

Die Auswertung von Blutmonozyten und Serumüberstand hat die Identifizierung von Auswirkungen der allergischen Rhinokonjunktivitis sowie des allergischen Asthmas auf systemischer Ebene zum Ziel. Betrachtet wurden eine Auswahl der Monozyten-Marker für die FACS-Analyse, die intra- und extrazellulär gefärbten Antigene sowie der Serumüberstand.

Das Gating für die FACS-Analyse der Monozyten erfolgte mittels folgender Marker: CD45<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> und HLA-DR<sup>+</sup>. Durchschnittlich 85,8 % der CD45<sup>+</sup>-PBMC waren CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten. Diese Messung stimmt mit den Literaturangaben von 85–90 % für klassische CD16<sup>-</sup>-Monozyten überein (Wong et al., 2012; Murphy et al., 2018, S. 98). Der Anteil an CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten an der gesamten PBMC-Population zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und betrug im Durchschnitt 14,2 %. Dieser Wert stimmt ebenfalls mit den Literaturangaben für einen Monozyten-Anteil von 10–20 % der PBMC überein (Kleiveland, 2015, S. 162). Im Folgenden werden die CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten mit Rücksicht auf die Lesbarkeit erneut vereinfachend als Monozyten bezeichnet.

Im Rahmen der explorativen Analyse von Zytokinen wurde die Expression von IFN- $\gamma$ , IL-10 sowie IP-10 in den Monozyten fluoreszenzbasiert bestimmt. Die Auswertung der Expression von IFN- $\gamma$  und IL-10 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Analyse des Chemokins IP-10 zeigte hingegen eine geringere Expression in der Gruppe der

AR sowie eine erhöhte Expression in der Gruppe der AA und der SE, jeweils im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Die geringere IP-10-Produktion der Gruppe der AR lässt sich in Bezug auf das TH1 / TH2-Ungleichgewicht bei allergischen Reaktionen gut einordnen. Die Produktion des Chemokins IP-10 wird durch IFN- $\gamma$  induziert und führt zu einer verstärkten TH1-Reaktion. Verminderte IP-10-Werte führen zu einer abgeschwächten TH1-Reaktion und somit zu einer Stärkung der TH2-Antwort. Die Rolle von IP-10 bei Patienten mit allergischer Rhinitis ist jedoch nicht vollständig geklärt. In die Bewertung der Ergebnisse werden im Folgenden die Wirkung am CXCR3-Rezeptor, die Rolle von Histamin sowie der AIT miteinbezogen.

Campbell, Gangur, Simons und HayGlass (2004) zeigen, dass eine Bindung von IP-10 an den CXCR3-Rezeptor auf T-Zellen über eine verstärkte TH1-Reaktion zu einer klinischen Toleranz gegenüber Gräserpollen führt. Allerdings führen die Autoren die abgeschwächte IP-10-Wirkung bei Allergikern nicht auf eine verminderte IP-10-Expression, sondern ein vermindertes Ansprechen des CXCR3-Rezeptors auf dessen Liganden zurück. Die Tatsache, dass IP-10 zur Entwicklung einer klinischen Toleranz gegenüber Allergenen beiträgt, bietet jedoch eine Erklärung für die erhöhten IP-10-Werte, die für die Gruppe der SE gemessen wurden. Ein weiterer Aspekt in der Bewertung des verminderten IP-10-Wertes der Gruppe der AR ist das Molekül Histamin. Studien konnten eine Verringerung von IP-10 sowohl durch Histamin direkt als auch durch Antihistaminika zeigen (Glatzer et al., 2014; Hung et al., 2007). Beide Mechanismen könnten bei der Gruppe der AR dieser Studie auftreten, da sowohl Histamin im Rahmen der allergischen Reaktion ausgeschüttet als auch Antihistaminika eingenommen wurden. Der Einfluss der AIT im Bezug auf die IP-10-Ausschüttung wurde von Cosmi et al. (2006) näher untersucht: In PBMC-Proben von Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie wurden nach zwölf Monaten einer AIT erhöhte IP-10 Spiegel gemessen. Eine Immuntherapie verringert möglicherweise die TH2-Inflammation durch eine verminderte Suppression der TH1-Zytokine. Passend zeigte in dieser Studie insbesondere die Gruppe der AR ohne AIT herabgesetzte IP-10-Werte.

Die Rolle von IP-10 bei Asthmatikern ist in der Literatur einheitlicher beschrieben: Asthmastiker weisen erhöhte IP-10-Werte auf. Das Entzündungsprofil bei allergischem Asthma wird als heterogen beschrieben und weicht oft vom klassischen TH2-gewichteten Profil ab (Kim, DeKruyff & Umetsu, 2010). Neben der lokalen bronchialen Erhöhung, die im subsection 4.1.3 diskutiert wird, konnten auch andere Studien erhöhte IP-10-Werte in den Plasma-Spiegeln von Allergikern während der akuten Exazerbation messen (Lai et al., 2008; Ragusa & Fallahi, 2017). Unklar bleibt, ob die Monozyten über die IP-10-Expression versuchen der allergischen Inflammation entgegenzusteuern oder die asthmatische Entzündung mit aktivieren.

Neben den intrazellulären Zytokinen wurden die beiden Oberflächenmarker PD-L1 und PD-L2 auf den CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Analyse der PD-L2-Expression auf den Monozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Die Auswertung der PD-L1-Expression zeigte jedoch signifikante Differenzen auf: Studienteilnehmer ohne AIT wiesen eine signifikant geringere PD-L1-Expression auf, jeweils im Vergleich zu den Studienteilnehmern mit AIT und den Studienteilnehmern der Gruppe der SE. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte sich lediglich ein nicht-signifikanter Trend. Diese Ergebnisse deuten auf eine protektive Wirkung der PD-L1-Expression hin, die sowohl die Studienteilnehmer mit AIT als auch die Gruppe der SE vor einer allergischen Immunreaktion schützt. Die Wirkung von PD-L1 erfolgt über eine Bindung an dessen PD-1-Rezeptor auf T-Zellen. Bei Allergen-Stimulation wirkt der PD-1-Rezeptor inhibierend auf die Proliferation und die Zytokin-Expression allergenspezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Roskopf, Jahn-Schmid, Schmetterer, Zlabinger & Steinberger, 2018). Neben der direkten Hemmung von aktiven T-Zellen führt PD-L1 auf APC auch zu einer Konversion von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen, welche wiederum zur Hemmung der allergischen Reaktion beitragen (de Roock et al., 2011; Francisco et al., 2009; Murphy et al., 2018, S. 366). Auch Palomares et al. (2018) haben eine verstärkte PD-L1-Expression auf von Monozyten abstammenden dendritischen Zellen bei Patienten mit Pfirsich-Allergie nach AIT gemessen. Eine weitere Studie konnte ebenfalls bei Patienten mit Beifußpollen-Allergie nach einer AIT eine erhöhte PD-L1-Expression bei CD14<sup>+</sup>-PBMC messen (Piconi et al., 2010). Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen die These, dass die Wirkung der AIT über eine verstärkte PD-L1-Expression auf Monozyten mitbestimmt wird.

In dieser Studie wurden weiterhin die beiden Moleküle Neopterin undIDO im Serumüberstand untersucht – sowohl innerhalb als auch außerhalb der Allergiesaison. Neopterin wird unter anderem in Monozyten als Oxidationsschutz bei zellulärem Stress produziert (Murr et al., 2002). In den Serumüberständen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Neopterin-Werten. Differenzen konnten auf lokaler Ebene – im Sputum – gemessen werden (subsection 4.1.3).

Die IDO-Aktivität im Serumüberstand der Studienteilnehmer war signifikant erhöht in der Gruppe der Allergiker ohne AIT in der IS im Vergleich zur OS. Besonders die Gruppe der AA ohne AIT wies im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte IDO-Aktivität in der IS auf. Hierfür können zwei Erklärungsansätze herangezogen werden. Entweder bewirkt die erhöhte IDO-Aktivität in der IS eine Verstärkung der Inflammation oder das Immunsystem versucht durch eine verstärkte IDO-Wirkung der allergischen Entzündung entgegenzuwirken. Ersteres — also eine proinflammatorische Rolle von IDO — wird durch eine Studie von H. Xu et al. (2008) unterstützt. Im Mausmodell konnte bei IDO-Knockout-Mäusen eine herabgesetzte TH2-Antwort festgestellt werden (H. Xu et al., 2008). Der zweite Erklärungsansatz hingegen wurde von einer Vielzahl anderer Studien bewiesen. Das Enzym IDO baut Tryptophan zu Kynurenin ab und hemmt auf diese Weise die T-Zell-aktivierende Wirkung von Tryptophan. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass IDO selbst als Transkriptionsfaktor wirksam ist und die Wirkung regulatorischer T-Zellen verstärkt (Munn & Mellor, 2013). Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen wurde die regulierende Wirkung von IDO im Formenkreis der allergischen Erkrankungen aufgezeigt (Buyuktiryaki et al., 2016; Luukkainen et al., 2014; Raitala,

Karjalainen, Oja, Kosunen & Hurme, 2006; von Bubnoff & Bieber, 2012). In diesen Studien wurde allerdings im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit eine herabgesetzte IDO-Aktivität bei Allergikern gemessen, die für eine fehlende regulatorische Wirkung des Enzyms im Rahmen der allergischen Reaktion sprechen. Dieser Widerspruch wurde auch von Refaat et al. (2015) beobachtet, die ebenfalls erhöhte IDO-Werte im Serum von Allergikern gemessen haben. Allerdings wurde nicht die IDO-Aktivität bestimmt, sondern die IDO-Konzentration ermittelt (Refaat et al., 2015). Ein Grund für die unterschiedlichen Messungen kann sein, dass die systemische IDO-Aktivität von einer Vielzahl von allgemeinen Prozessen im Körper abhängig ist und durch unbekannte Belastungen des Immunsystems beeinflusst werden kann (Munn & Mellor, 2013).

Hinsichtlich der IDO-Aktivität im Serum stützen zwei weitere Aspekte den regulativen Charakter des Enzyms: Die Messung der Aktivität bei asymptomatischen Atopikern sowie bei Patienten mit AIT. Von Bubnoff et al. (2004) konnten eine erhöhte IDO-Aktivität bei asymptomatischen Atopikern im Vergleich zu symptomatischen Patienten messen. Dieses Ergebnis lässt einen Zusammenhang zwischen der IDO-Aktivität und der klinischen Symptomatik sowie Toleranz gegenüber Allergenen vermuten. Die Gruppe der SE dieser Studie zeigten im Serum allerdings keine erhöhte IDO-Aktivität. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der IDO-Aktivität und der Immuntherapie gezeigt werden. Im Mausmodell führte die Hemmung von IDO zu einer herabgesetzten Wirkung der OVA-Immuntherapie. Die Ergebnisse sprechen für eine zentrale Rolle von IDO in der Reduktion der Anzahl an eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen sowie der Th2-Zytokine (Taher et al., 2008). Eine andere Studie konnte bei Patienten mit Immuntherapie gegen Insektengift-Allergie eine erhöhte IDO-Aktivität im Serum nachweisen (Bussmann et al., 2010). Diese Arbeit konnte allerdings keine Veränderungen in der Gruppe mit AIT im Vergleich zu den Studienteilnehmern ohne AIT in den Serumproben messen. Schlussfolgernd ist die IDO-Aktivität im Serum in Anbetracht von möglichen Störfaktoren auf systemischer Ebene insbesondere bei kleinen Gruppen kein zuverlässiger Indikator. Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten sowie ein direkter Vergleich derselben Patientengruppe vor und nach der AIT sind notwendig, um detailliertere Erkenntnisse zu gewinnen.

Die IDO-Aktivität wurde durch die Analyse der Tryptophan- und Kynurenin-Konzentrationen bestimmt. Im Serumüberstand waren die Tryptophan-Werte in der Gruppe der AR mit AIT signifikant erniedrigt, jeweils gegenüber der Gruppe der AR ohne AIT, der Gruppe der AA mit AIT sowie der Kontrollgruppe. Auch die Kynurenin-Werte in der Gruppe der AR mit AIT waren verringert. Da die IDO-Aktivität allerdings aus dem Quotienten von Tryptophan und Kynurenin hergeleitet wird, haben diese Ergebnisse keinen Einfluss auf die IDO-Aktivität. Da Kynurenin wiederum metabolisiert wird, könnten diese Messungen auch auf eine erhöhte IDO-Aktivität in der Gruppe der AR mit AIT hinweisen. Bei gleicher IDO-Aktivität könnte ein Grund für die niedrigeren Werte eine geringere Zufuhr der essentiellen Aminosäure Tryptophan sein. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssen weitere Metaboliten des IDO-Stoffwechsels gemessen werden.

Es konnte eine positive Korrelation zwischen dem Anteil an Monozyten der PBMC und der errechnetenIDO-Aktivität gemessen werden. Dieses Ergebnis kann als Hinweis für die Produktion vonIDO durch die Monozyten dienen, welches einen regulativen Charakter dieser unterstützen würde (von Bubnoff et al., 2002).

Zusammenfassend repräsentieren die Ergebnisse die vielseitige Rolle der klassischen Monozyten. Bevor diese im Gewebe zu Makrophagen differenzieren, wirken Monozyten selber als Effektorzellen und produzieren Zytokine (Murray, 2018). Hierbei bewirken sie eine Aktivierung des Immunsystems. Beispielsweise die Expression von IP-10 führt zu einer Rekrutierung von aktivierten TH-Zellen. Diese Arbeit zeigte ein verändertes Expressionsmuster von IP-10 in der Gruppe der AR sowie der Gruppe der AA. Die Daten weisen auf eine Dysregulation der Monozyten im Rahmen der allergischen Inflammation hin. Jedoch gibt es auch Hinweise für einen protektiven Charakter der Monozyten (Murray, 2018). Im Einklang hiermit konnte diese Arbeit eine erhöhte PD-L1-Expression der Monozyten von Studienteilnehmern mit AIT nachweisen. Außerdem gilt dieIDO-Aktivität als regulierende Komponente allergischer Erkrankungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine mögliche Produktion vonIDO durch Monozyten hin.

#### **4.1.3. Lokale Ebene**

Für die Analyse der Veränderungen im Rahmen der allergischen Rhinitis sowie des allergischen Asthmas auf lokaler Ebene wurde eine Sputuminduktion durchgeführt. Das gewonnene Material diente als Abbild des bronchialen Entzündungsgeschehens. Der folgende Abschnitt beinhaltet die Bewertung der Sputum-Qualität, der Zytospin-Daten, der Auswahl der Makrophagen-Marker für die FACS-Analyse, der intra- und extrazellulär gefärbten Antigene sowie des Sputumüberstandes.

Eine hohe Sputum-Qualität ist essentiell für eine aussagekräftige Analyse des Sputums. Qualitätskriterien für Sputumproben sind eine geringe Anzahl squamöser und toter Zellen sowie eine hohe Gesamtleukozytenzahl. Ein Grenzwert von 15 % squamöser Zellen sollte nicht überschritten werden (Zissler, 2012, S. 57). Die Auswertung der Proben dieser Arbeit zeigte sowohl in der IS als auch in der OS nur Werte unter 10 %. Somit konnte durch die Befolgung der SOP in allen Proben ein Anteil von über 80 % lebender Leukozyten erreicht werden (Zissler, 2012, S. 63). In der OS war die Gesamtleukozytenzahl im Sputum sowie die Anzahl der Leukozyten pro Milliliter Sputum – die Zelllast – im Vergleich zur IS in allen Gruppen signifikant höher. Da das Gewicht des selektierten Sputums in der IS im Vergleich zur OS keinen Unterschied aufwies, ist die erhöhte Gesamtleukozytenzahl auf eine erhöhte Zelllast zurückzuführen. Bezüglich der Zelllast gibt es Hinweise, die für einen zirkannualen Einfluss sprechen (Haus & Smolensky, 1999). Laut Reinberg, Schuller, Delasnerie, Clench und Helary (1977) folgen die Werte einem monatlichen Rhythmus, der einen Hochpunkt im Dezember aufweist. Eine andere Studie stellte hingegen vor allem im Sommer erhöhte Leukozyten-Werte fest (Röcker, Feddersen, Hoffmeister & Junge, 1980). Auch ein abgelaufener Atemwegsinfekt im Winter kann einen Einfluss auf die Menge und Zelllast des Sputums haben (Kardos et al.,

2019, S.173).

Die Analyse der Zytospin-Daten zeigte einen erhöhten Makrophagen-Anteil in der Zytospin-Auswertung im Vergleich zu den FACS-Daten. Die Differenz leitet sich durch eine spezifischere Messung durch das FACS-Gerät ab. Mononukleäre Zellen können mikroskopisch weniger differenziert werden. Diese Beobachtung wurde bereits in vorhergehenden Studien beschrieben (Zissler, 2012).

Die Auswahl der Sputummakrophagen für die FACS-Analyse erfolgte durch folgende Marker: CD45<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> und HLA-DR<sup>+</sup>. Die Analyse zeigte einen durchschnittlichen Anteil der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen von 6,1 % in Bezug auf die Gesamtheit der Sputumzellen. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen. In der Literatur wird der Anteil an Makrophagen im Sputum durchschnittlich mit 40–80 % der Zellen angegeben (Davidson, The & Leigh, 2013; Vidal et al., 2012; Zissler, 2012). Hieraus lässt sich ableiten, dass in dieser Studie eine spezielle Untergruppe der Sputummakrophagen untersucht wurde. Im Folgenden werden die CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen mit Rücksicht auf die Lesbarkeit erneut vereinfachend als Makrophagen bezeichnet.

Für die explorative Analyse von Zytokinen wurde die Expression der intrazellulären Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10 sowie IP-10 der Makrophagen fluoreszenzbasiert bestimmt. Die Auswertung der Expression von IL-10 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Analyse der anderen beiden Zytokine wies eine signifikant geringere Bildung von IFN- $\gamma$  und IP-10 in Makrophagen der Gruppe der AR im Vergleich der Gruppe der AA sowie der Kontrollgruppe auf. Die erniedrigten Werte der Gruppe der AR könnten auf die TH2-gerichtete allergische Reaktion zurückzuführen sein, die eine Unterdrückung der Bildung von TH1-Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und IP-10 bewirkt (Murphy et al., 2018, S. 485). Mamessier et al. (2007) haben ebenfalls eine erniedrigte Expression von IFN- $\gamma$  bei Patienten mit allergischer Rhinitis im Sputum gemessen. Allerdings wurde die Expression von IFN- $\gamma$  in T-Zellen gemessen. TH1-Zellen lösen durch die Produktion von IFN- $\gamma$  einen positiven Feedback-Mechanismus aus, indem IFN- $\gamma$  wiederum die Differenzierung von TH1-Zellen fördert (Murphy et al., 2018, S. 485). Auch Makrophagen werden durch IFN- $\gamma$  aktiviert. Die Daten dieser Studie weisen möglicherweise auf eine ähnliche IFN- $\gamma$  Rückkopplungsreaktion der Makrophagen hin, die durch die allergische Reaktion der Rhinitiker eingeschränkt wird. Weiterhin kann dieser Mechanismus ebenfalls zu einer Reduktion der IP-10-Produktion führen, die von IFN- $\gamma$  abhängig ist. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Expression von IP-10 im Sputum von Patienten mit allergischer Rhinitis untersucht, wobei herabgesetzte Werte festgestellt wurden.

Die im Gegensatz zu den Rhinitikern erhöhte Produktion von IP-10 im Sputum von Patienten mit allergischem Asthma wurde hingegen auch von anderen Studien gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde in Makrophagen eine erhöhte Produktion von IP-10 in der Gruppe der AA im Vergleich zu der Gruppe der AR festgestellt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte sich allerdings nur ein nicht-signifikanter Trend. Auch Takaku et al. (2016) ermittelten erhöhte

IP-10-Spiegel im Sputum von Asthmatikern. Andere Studien zeigten erhöhte IP-10-Werte in der bronchoalveolären Lavage bei Asthmatikern unter Allergen-Provokation (Bochner, Hudson, Xiao & Liu, 2003; Pilette, Francis, Till & Durham, 2004). Die Autoren argumentieren, dass sich bei allergischem Asthma neben der akuten TH2-gerichteten Reaktion auf Allergene im Verlauf eine chronische Erkrankung mit einem TH1/TH2-gemischtem Entzündungsprofil entwickelt. Im Mausmodell führte IP-10 zu einer bronchialen Hyperaktivität. Die Autoren verweisen auf eine mögliche Aktivierung der TH2-Zellen sowie eosinophilen Granulozyten durch eine Bindung von IP-10 an den CXCR3-Rezeptor auf TH2-Zellen (Medoff et al., 2002). Weiterhin zeigte eine Studie von Erin et al. (2005), dass Steroide zu einer Verringerung der Expression von IP-10 führen können. Welche Rolle die Expression von IP-10 durch Makrophagen einnimmt ist noch nicht vollständig geklärt. W. Xu et al. (2012) haben gezeigt, dass die Produktion von IP-10 durch Makrophagen zur Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen führt. Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse eine unterschiedliche IP-10-Expression in der Gruppe der AR und der Gruppe der AA auf, die sowohl bei Monozyten als auch Makrophagen gemessen werden konnte. Die Daten stehen im Einklang mit der These, dass die IP-10-Produktion der Zellen über eine positive Rückkopplung die asthmatische Inflammation verstärkt.

Neben den intrazellulären Zytokinen wurden die beiden Oberflächenmarker PD-L1 und PD-L2 auf den CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen in der FACS-Analyse betrachtet. Die Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied in der Expression: Die Gruppe der AA wiesen im Vergleich zu der Gruppe der AR sowie der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Expression von PD-L1 sowie PD-L2 durch Makrophagen auf.

Die Liganden PD-L1 sowie PD-L2 hemmen die Aktivität von T-Zellen (Singh et al., 2011; Murphy et al., 2018, S. 366). Durch deren Expression tragen Makrophagen als APC im Rahmen der Immunantwort möglicherweise zu einer Regulation der allergischen Inflammation bei. Die Expression von PD-L1 sowie PD-L2 auf Makrophagen trat im Mausmodell bei allergischem Asthma verstärkt nach Allergenprovokation auf. Die Blockierung von PD-L2 führte zu einer abgeschwächten bronchialen Hyperaktivität und Eosinophilie. Matsumoto et al. (2004) vermuten, dass PD-L2 über eine verstärkte Aktivität von IFN- $\gamma$  zu einer Abschwächung der asthmatischen Entzündung im Lungengewebe führt. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine erhöhte bronchiale Hyperaktivität sowie IL-4-Produktion bei PD-L2-Knockout-Mäusen (Akbari et al., 2010). Andererseits zeigten PD-L1-Knockout-Mäuse eine abgeschwächte bronchiale Hyperaktivität und erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion durch natürliche Killerzellen (Akbari et al., 2010). Diese Studien sprechen für eine protektive Wirkung von PD-L2 gegenüber der Entwicklung von Asthma und möglicherweise kontroverse Wirkung von PD-L1. Andererseits zeigten Lewkowich et al. (2013), dass die PD-L2 Expression auf dendritischen Zellen in der bronchialen Biopsie mit der Schwere des Asthmas korrelierte. PD-L2 korrelierte mit einer verminderten IL-12-Produktion, die wiederum mit einer vermehrten bronchialen Inflammation einhergeht. Auch eine weitere Studie konnte nach Hemmung von PD-L2 eine verstärkte bronchiale Inflammation im Maus-Asthmamodell messen (Oflazoglu et al., 2004). Diese Zusammenfas-



sung zeigt, dass in der Literatur verschiedene, widersprüchliche Ansätze und Ergebnisse diskutiert werden. Es bleibt unklar, ob die erhöhte Expression der PD-Liganden durch Makrophagen die asthmatische Inflammation abschwächen oder verstärken.

In der Pathogenese des Asthmas spielt des Weiteren ein Ungleichgewicht des Verhältnisses von TH17- und regulatorischen T-Zellen eine Rolle (Zissler, Jakwerth et al., 2018). McAlees et al. (2015) vermuten eine protektive Wirkung von PD-L1 in der Entwicklung eines schweren Asthmas durch die Hemmung von TH17-Zellen. Andererseits führt PD-L1 auch zu einer Hemmung von regulatorischen T-Zellen, die nach Xi, Liu und Guo (2018) im inflammatorischen Milieu sensitiver bezüglich der PD-L1/PD-1 Bindung sind als TH17-Zellen. Die Blockade von PD-1 würde somit zu einer Verminderung von TH17-Zellen und einer Erhöhung von regulatorischen T-Zellen beitragen, was eine Abschwächung der bronchialen Inflammation zur Folge hätte. Die Studienlage zeigt eine komplexe Regulation der unterschiedlichen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch die PD-1/PD-L-Achse, die nicht vollständig verstanden wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen eine Rolle der PD-Liganden in der Asthma-Pathogenese.

Die Analyse des Einflusses der AIT verdeutlicht, dass insbesondere die Makrophagen der AA ohne AIT verstärkt PD-L1 produzierten. Möglicherweise reduziert das besser kontrollierte Asthma nach der AIT die Notwendigkeit der regulierenden Rolle der Makrophagen. Die PD-1/PD-L1-Verbindung bewirkt im Mausmodell eine Hemmung der Aktivität von TH17-Zellen, welche in der Entwicklung von schwerem Asthma eine Rolle spielen (McAlees et al., 2015). Im Gegensatz dazu exprimierten insbesondere die Makrophagen der Gruppe AA mit AIT gegenüber der Kontrollgruppe verstärkt PD-L2. Die verstärkte PD-L2-Expression kann im Rahmen der AIT zum Schutz des Lungengewebes beitragen. Über den Liganden PD-L2 können Makrophagen die Wirkung von aktiven TH2-Zellen abschwächen (Matsumoto et al., 2004). Um den Einfluss der AIT genau zu evaluieren, sind größere Fallzahlen sowie eine regelmäßige Untersuchung der Studienteilnehmer während der Therapie notwendig.

In dieser Arbeit wurden auch im Sputumüberstand die beiden Moleküle Neopterin undIDO analysiert – sowohl in der IS als auch in der OS. Im Gegensatz zum Serumüberstand zeigten sich signifikante Unterschiede in den Neopterin-Spiegeln zwischen den Proben. Im folgenden Abschnitt wird der Vergleich der Neopterin-Werte zwischen der IS und der OS, die Rolle der Immuntherapie und der asthmatischen Komponente sowie die Produktion durch Makrophagen diskutiert.

Im Sputumüberstand waren in der IS signifikant geringere Neopterin-Werte messbar als in der OS. Erhöhte Neopterin-Spiegel im Winter im Vergleich zum Sommer wurden auch von Mohyuddin et al. (2017) nachgewiesen. Ursächlich könnte hierfür eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems im Winter sein. Neopterin wird in Makrophagen vermehrt unter oxidativem Stress im Rahmen einer Oxidationsreaktion produziert (Giese, Baxter-Parker & Lindsay, 2018; Gostner, Becker, Kofler, Strasser & Fuchs, 2016). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem einen Einfluss der Immuntherapie. Vor allem die Studienteil-

nehmer mit AIT wiesen in der IS im Vergleich zur OS geringere Neopterin-Werte im Sputum auf. Auch Ciprandi, De Amici, Marseglia und Fuchs (2010) konnten bei Allergikern mit AIT verringerte Neopterin-Serumwerte im Vergleich zu Studienteilnehmern ohne AIT nachweisen. Allerdings wurden in dieser Studie Serum-Spiegel bestimmt (Ciprandi et al., 2010). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Hypothese, dass eine erfolgreiche AIT die pulmonale Inflammation während der Allergiesaison vermindert. Reduzierter zellulärer Stress führt zu einer verringerten Neopterin-Produktion im Vergleich zu den Studienteilnehmern ohne AIT.

Neben der Immuntherapie beeinflusst auch die asthmatische Komponente der allergischen Erkrankung den Neopterin-Spiegel. Die Werte der Gruppe der AA ohne AIT waren sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch der Gruppe der AR ohne AIT in beiden Saisons erhöht. Warwick, Thomas und Yates (2013) haben deutlich erhöhte Neopterin-Werte bei Asthmatikern im Sputum während der Exazerbation gemessen. Auch bei Kindern, die an Asthma erkrankt sind, konnten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Neopterin-Werte im Serum nachgewiesen werden (Licari et al., 2019). Die erhöhten Neopterin-Werte im Sputum repräsentieren die lokale Inflammation in der Gruppe der AA während der Allergiesaison. Die Daten dieser Arbeit sprechen für den Einsatz von Neopterin als Sputum-Marker für eine erfolgreiche AIT bei Asthmatikern.

Makrophagen zählen zu den Hauptproduzenten von Neopterin (Murr et al., 2002). Die Auswertung ergab eine positive Korrelation zwischen den Neopterin-Werten und dem Anteil an CD16<sup>-</sup>-Makrophagen der Sputumzellen. Diese Messungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Neopterin-Produktion und den CD16<sup>-</sup>-Makrophagen hin. Diese Makrophagen weisen möglicherweise eine M1-Polarisierung auf und werden durch IL-12 aktiviert (Boorsma, Draijer & Melgert, 2013; Yoshiyama et al., 2018).

Die Diskussion derIDO-Aktivität im Sputumüberstand bezieht sich auf die direkte und die indirekte Auswertung über den Tryptophan-Wert, die Rolle der AIT sowie die Korrelation mit dem Anteil an Makrophagen und dem Neopterin-Wert.

Das Enzym IDO dient unter anderem der Regulation von Immunantworten. Die Bestimmung der IDO-Aktivität im Sputumüberstand war lediglich bei zwei Studienteilnehmern möglich, da nur in diesen Proben die Kynurenin-Werte bestimmt werden konnten. Die Probe eines Kontroll-Studienteilnehmers wies eine vierfach höhere IDO-Aktivität als die Probe des Studienteilnehmers der Gruppe der AA ohne AIT auf. Durch die fehlenden Daten der anderen Proben können keine direkten Aussagen über die IDO-Aktivität im Sputum geschlussfolgert werden. Ein indirekter Hinweis auf die IDO-Aktivität kann aus den Tryptophan-Werten hergeleitet werden.

Die Tryptophan-Konzentration war in den Sputumüberständen der Allergiker sowohl mit als auch ohne AIT in der IS im Vergleich zur OS signifikant erhöht. Ein geringerer Tryptophan-Umsatz weist auf eine niedrigere IDO-Aktivität hin, da IDO das hauptverantwortliche Enzym

für den Tryptophan-Umsatz ist (Gostner et al., 2016). Ursächlich für die erniedrigte IDO-Aktivität der Allergiker in der Allergiesaison könnte das Molekül NO sein, welches bei Allergikern vermehrt gebildet und eine Hemmung der IDO-Aktivität bewirkt (Gostner et al., 2016; Kharitonov, Rajakulasingam, O'Connor, Durham & Barnes, 1997). Auch ein genetischer Polymorphismus im IDO-Gen könnte zu einer herabgesetzten Aktivität beitragen (von Bubnoff & Bieber, 2012). Andere Studien bestätigen diesen Ansatz und messen herabgesetzte IDO-Werte im Atemkondensat und Sputum von Patienten mit allergischem Asthma. Inhalative Kortikosteroide führten zu einer Steigerung der IDO-Aktivität, welche mit der IL-10 Produktion durch Makrophagen korrelierte (Maneechotesuwan et al., 2008; van der Sluijs et al., 2013). Luukkainen et al. (2011) untersuchten hingegen Proben der nasalen Schleimhaut und konnten bei Patienten mit allergischer Rhinitis im Vergleich zu der Kontrollgruppe keinen Unterschied feststellen. Zusammenfassend stehen die Daten dieser Arbeit im Einklang mit der Literatur und sprechen für eine lokale antiinflammatorische Rolle des IDO-Metabolismus vor allem im unteren Atemtrakt. Die Ergebnisse zeigten allerdings keinen Einfluss der AIT auf die lokale IDO-Aktivität.

Das Enzym IDO wird in 96 % der Makrophagen exprimiert (Maneechotesuwan et al., 2008). Eine positive Korrelation wurde zwischen dem prozentualen Anteil an CD16<sup>-</sup>-Makrophagen und den Tryptophan-Werten gemessen, was für eine herabgesetzte IDO-Aktivität dieser Zellen spricht. Außerdem bestand eine positive Korrelation zwischen den Neopterin und Tryptophan-Werten in der IS. Sowohl die Neopterin-Produktion als auch die IDO-Aktivität werden durch IFN- $\gamma$  induziert. Erhöhte NO-Spiegel bei Allergikern hemmen die IDO-Produktion. Das Neopterin-produzierende Enzym GTP-Cyclohydrolase 1 wird allerdings nicht durch NO gehemmt (Gostner et al., 2016). Schlussfolgernd stellen die erhöhten Neopterin- sowie Tryptophan-Spiegel keinen Widerspruch dar und weisen auf einen gemeinsamen Pathomechanismus hin.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse die unterschiedliche Regulation der Makrophagen von Rhinitikern und Asthmatikern. Die erniedrigte Expression von IFN- $\gamma$  und IP-10 der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen in der Gruppe der AR spiegelt die vorwiegend TH2-gerichtete Inflammation wider. Die Makrophagen der Gruppe der AA wiesen hingegen erhöhte IP-10-Werte auf. Das Chemokin trägt bei diesen Patienten möglicherweise zur Aufrechterhaltung der bronchialen Inflammation bei. Außerdem deuten die Daten auf eine herabgesetzte IDO-Aktivität bei Allergikern hin, welche die Entzündung ebenfalls verstärken kann. Die Inflammation in der Gruppe der AA ohne AIT wird durch erhöhte Neopterin-Werte im Sputum abgebildet. Andererseits weist die erhöhte Expression der Liganden PD-L1 sowie PD-L2 bei Asthmatikern auf regulative Eigenschaften einiger Makrophagen hin.

#### **4.1.4. Vergleich der Ebenen**

Der Vergleich der systemischen mit der lokalen Ebene spiegelt die unterschiedlichen Rollen der Monozyten beziehungsweise Makrophagen bei Allergikern wider. Beide Zelltypen gehören zum MPS und weisen sowohl protektive als auch pathogene Eigenschaften auf.

Die Gliederung in verschiedene Phänotypen wird in der Literatur umfänglich diskutiert (Murray, 2017, 2018; Murray & Wynn, 2011). Ziel dieser Studie war es, durch die Analyse der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten und Makrophagen weitere Erkenntnisse über die Charakterisierung der Phänotypen sowie die Pathogenese des allergischen Asthmas zu erlangen.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie verdeutlichen ein unterschiedliches Zytokin-Expressionsmuster der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten und -Makrophagen. Die Auswertung der Daten aller Studienteilnehmer zeigte, dass CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten im Vergleich signifikant mehr PD-L1 sowie IP-10 und CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen signifikant mehr PD-L2 sowie IL-10 produzierten.

Durchschnittlich 85 % der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten exprimierten das Chemokin IP-10. Die chemotaktische Aktivität ist neben der Phagozytose eine klassische Aufgabe der Monozyten. Bei Verletzung von Gewebe oder Infektionen werden durch Chemokine weitere Immunzellen zum Entzündungsort rekrutiert (Grage-Griebenow, Flad & Ernst, 2001). Während IP-10 möglicherweise zur Inflammation des Asthmas beiträgt, kann die Rekrutierung von vor allem TH1-Zellen auch als gegensätzliche Wirkung zur TH2-gerichteten allergischen Reaktion angesehen werden. Murray (2018) vermutet, dass Monozyten selber durch die Produktion von Sauerstoffradikalen sowie Phagozytose pathogenetisch relevant sind, aber auch protektive Eigenschaften besitzen. Die These der protektiven Wirkung wird von dieser Arbeit durch eine PD-L1-Expression der Monozyten unterstützt. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Anteil an CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten der Gesamtmonozyten sowie derIDO-Aktivität gemessen werden, was den regulativen Charakter der Zellen bekräftigt. Veremeyko et al. (2013) haben die microRNA von Monozyten und Makrophagen verglichen und stellten die Klassifikation der Monozyten anhand der CD14- und CD16-Expression in Zusammenhang mit der M1-M2-Unterteilung. Klassische Monozyten wiesen hierbei Eigenschaften sowohl von M1- als auch M2-Zellen auf. Die Daten dieser Arbeit stehen hiermit im Einklang.

Die Gliederung der Makrophagen wird in der Literatur vielfältig beschrieben. Zusammenfassend kristallisiert sich eine Unterscheidung in M1, M2 und M2-ähnliche / regulatorische Zellen heraus (Draijer et al., 2017). Durchschnittlich 32 % der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen zeigten eine IL-10-Produktion und sind somit am ehesten dem regulatorischen Phänotyp zuzuordnen. Weiterhin unterstützt die regulative PD-L2-Produktion diese These. Die Daten repräsentieren aber auch die Plastizität der Zellen. Ein geringer Prozentsatz der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Makrophagen exprimierte IFN- $\gamma$  sowie IP-10 und wäre somit eher dem M1-Typ zuzuordnen. Die positive Korrelation des Anteils CD16<sup>-</sup>-Zellen mit den Neopterin-Werten deutet ebenfalls auf eine M1-Komponente hin. Allerdings konnte keine Korrelation mit den HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen gemessen werden. Insgesamt können CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen nicht eindeutig einem Phänotyp zugeordnet werden. Allerdings weisen sowohl die Monozyten als auch die Makrophagen dieses Subtyps klare regulatorische Eigenschaften auf. Im Hinblick

auf die asthmatische Erkrankung können diese Zellen möglicherweise schützende Funktionen einnehmen.

## 4.2. Limitationen

### 4.2.1. Untersuchungskollektiv

Die Limitationen bezüglich des Untersuchungskollektivs beziehen sich auf die Größe der Untergruppen, den Zeitpunkt der Untersuchung, Unterschiede im Alter und der Durchführung der AIT sowie Ko-Sensibilisierungen.

Das Untersuchungskollektiv bestand insgesamt aus 65 Studienteilnehmern in der IS und 63 Studienteilnehmern in der OS. In die Auswertung wurden nach Anwendung der Ausschlusskriterien die Daten von jeweils 58 Studienteilnehmern eingeschlossen. Die Untergruppen bestanden nach dem Ausschluss ex post aus mindestens sieben Studienteilnehmern. Um die Ergebnisse im Vergleich zu der Kontrollgruppe besser einzuordnen zu können, wäre eine höhere Anzahl an Studienteilnehmern notwendig gewesen.

Die Studie in der Allergiesaison orientierte sich am Pollenkalender der Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst (Werchan et al., 2018). Allerdings kam es trotzdem zu täglichen Schwankungen im Gräserpollenflug. Des Weiteren unterliegt die Produktion von Zytokinen einem zirkadianen Rhythmus (Haus & Smolensky, 1999). IFN- $\gamma$  wird beispielsweise vermehrt im Winter exprimiert (Katila, Cantell, Appelberg & Rimón, 1993). Der Monat der Untersuchung der einzelnen Studienteilnehmer könnte demzufolge einen unbekanntem Einflussfaktor darstellen. Diese Einschränkung bezieht sich auf den Vergleich der Daten zwischen den Untergruppen in einer Saison.

Die Gruppe der AA mit AIT war signifikant älter gegenüber der Kontrollgruppe, der Gruppe der SE sowie der Gruppe der AR ohne AIT. Allerdings zeigten die Korrelationsanalysen keinen Zusammenhang zwischen dem Alter und den Werten für Neopterin sowie Tryptophan, derIDO-Aktivität sowie dem Anteil an CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen. Deshalb wird nicht davon ausgegangen, dass dieser Altersunterschied die Auswertung der Daten beeinflusst hat.

Bezüglich der Durchführung der AIT ist eine potentielle Limitation, dass bei einem Studienteilnehmer die Durchführung der AIT zwölf Jahre zurück lag. Da der Studienteilnehmer trotzdem noch eine positive Wirkung beschrieb, wurde dieser nicht aus der Studie ausgeschlossen. Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss der Ko-Sensibilisierungen. Neben der Gräserpollenallergie als Hauptallergen wurde eine Ko-Sensibilisierung nicht als Ausschlusskriterium gewertet. Es ist möglich, dass eine Hausstaubmilbenallergie die Daten in der OS beeinflusst hat, da es sich um ein perenniales Allergen handelt. Allerdings gaben die Patienten in der OS eine signifikant geringere Symptombelastung an, was gegen einen starken Einfluss der Hausstaubmilbenallergie spricht.

#### 4.2.2. Labormethoden

Die potentiellen Limitationen im Bereich der Labormethoden beziehen sich auf die Durchflusszytometrie und die Messungen im Serum- und Sputumüberstand. Insgesamt ist die Auswertung limitiert durch ein einmaliges Abbild der Messungen und die fehlende Analyse dynamischer Veränderungen.

Limitationen bezüglich der Durchflusszytometrie beinhalten den möglichen Einschluss dendritischer Zellen sowie den fehlenden Vergleich der Daten zwischen der IS und der OS. Außerdem bleibt teilweise unklar, ob Makrophagen zur Inflammation beitragen oder lediglich die Expression der Zytokine eine Folge der allergischen Entzündung ist. Zukünftige Studien sollten diese Limitationen in ihre Planung miteinbeziehen.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte durch Gates, die die Analyse spezifischer Zellgruppen ermöglichen. Für die Analyse der Monozyten und Makrophagen wurden zunächst nur die lebenden Einzelzellen ausgewählt. Im zweiten Schritt wurden die Zellen nach ihrer Größe und Granularität sortiert. Mit Hilfe dieses Diagramms war es möglich sowohl im Serum als auch im Sputum T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten sowie dendritische Zellen aus der Auswertung auszuschließen. NK-Zellen und Granulozyten wurden zusätzlich durch das HLA-DR<sup>+</sup>-Gate ausgeschlossen (Autissier, Soulas, Burdo & Williams, 2010). Ein Teil der dendritischen Zellen weist jedoch eine ähnliche Größe und Granularität wie die Monozyten beziehungsweise Makrophagen auf. Diese Zellen sind ebenfalls CD16<sup>-</sup> und HLA-DR<sup>+</sup>. Da CD14 nicht als weiterer Marker angefärbt wurde, konnte diese Population dendritischer Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden. Allerdings nehmen dendritische Zellen im Gegensatz zu den 2–20 % Monozyten in der Blutzirkulation nur einen Anteil von 0,5–1 % der Gesamtzellzahl ein (Draxler, Madondo, Hanafi, Plebanski & Medcalf, 2017; Upham & Stumbles, 2003). Im Sputum überwiegt ebenfalls deutlich der Anteil der Makrophagen mit 30–95 % im Gegensatz zu einer dendritischen Population von insgesamt 0,5–1,5 % (Lay et al., 2011; McCarthy et al., 2007). Dennoch lag beispielsweise der Median der PD-L1-Expression nur bei 2,5 % der Monozyten in dieser Studie. Somit könnten die positiven Messungen auch mitunter auf die eingeschlossene Population der dendritischen Zellen zurückzuführen sein. Allerdings lag die PD-L1-Expression der Monozyten in anderen Studien im gleichen einstelligen Prozentbereich (Palomares et al., 2018; Piconi et al., 2010). Da die mögliche eingeschlossene Population dendritischer Zellen nur einen sehr kleinen Anteil darstellen, gehen wir nicht davon aus, dass die Validität der Ergebnisse beeinflusst wurde.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten konnte nur in der OS durchgeführt werden, da in der IS ein Gating der Monozyten und Makrophagen nicht möglich war. Somit konnte kein Vergleich zwischen den FACS-Daten der OS und der IS gezogen werden.

Potentielle Limitationen bezüglich der Messung des Serum- und Sputumüberstandes betreffen die Lagerung der Proben, den Metabolismus der Moleküle und eine Korrelation mit dem BMI.

Die Neopterin-Werte wurden mittels ELISA bestimmt. Die Langzeit-Lagerung der Proben sollte laut ELISA-Hersteller bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erfolgen. Der Hersteller machte keine exakten Zeitangaben bezüglich der Langzeit-Lagerung. Behringer, Stevens, Leendertz, Hohmann und Deschner (2017) konnten bei Neopterin-Urinproben nach zwei Jahren bei Lagerung im eingefrorenen Zustand noch konstante Werte ermitteln. Die Proben dieser Arbeit wurden vor der Analyse maximal 14 Monate eingefroren gelagert. Es wird nicht davon ausgegangen, dass die Lagerungen einen Einfluss auf die Konzentrationen in den Überständen hatte.

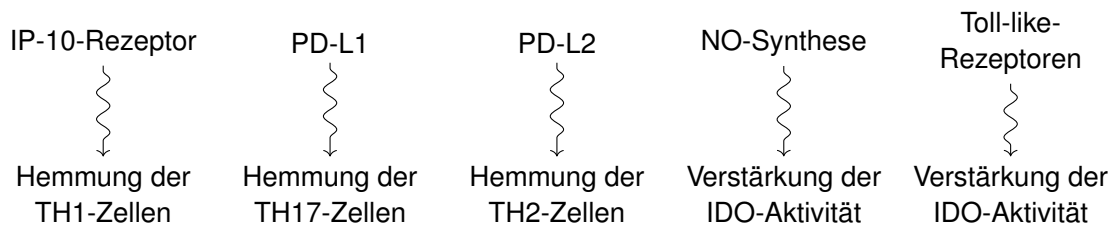
Eine potentielle Limitation der Neopterin-Messung bezieht sich auf den Metabolismus. Nach Gieseg et al. (2018) sollte die Messung von Neopterin ebenfalls den 7,8-Dihydroneopterin-Wert einschließen, um den oxidativen Stress und die zelluläre Inflammation ausreichend beurteilen zu können. 7,8-Dihydroneopterin ist das Nebenprodukt, das beim Abbau von Guanosintriphosphat zu Neopterin unter oxidativem Stress entsteht. Folglich stellt der Neopterin-Wert nur einen Ausschnitt in der Beurteilung der Inflammation dar.

Die Messung der IDO-Aktivität erfolgte mittels HPLC. Die IDO-Aktivität wurde nur indirekt durch die Bestimmung der Konzentrationen des Produktes Kynurenin und des Eduktes Tryptophan gemessen. Tryptophan kann jedoch auch von anderen Enzymen abgebaut werden und Kynurenin wird seinerseits in weitere Metaboliten umgewandelt. Im Sputum war technisch lediglich die Tryptophan- und nicht die Kynurenin-Messung möglich. Es konnte keine Kynurenin-Konzentration festgestellt werden.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass das Enzym Formylkynureninamidase, welches Formylkynurenin in Kynurenin umsetzt, nicht im Lungengewebe exprimiert wird. Formylkynurenin ist ein Zwischenprodukt des Tryptophan-Abbaus (Badawy, 2017). Durch diese Einschränkung konnten keine direkten Aussagen über die IDO-Aktivität im Sputum getroffen werden. Es sind weitere Studien mit einer direkten Messung der Indolamin-2,3-Dioxygenase und weiteren Metaboliten notwendig, um die Ergebnisse im größeren Kontext bewerten zu können.

Da die Messungen von Neopterin und IDO-Metaboliten in Sputum- und Serumüberständen durchgeführt wurden, ist es nicht möglich einen Rückschluss auf die produzierende Zelle zu schließen.

Die Korrelationsanalyse ergab einen signifikanten Zusammenhang in der IS zwischen der IDO-Aktivität im Serum und dem BMI. Mallmann, Lima und Lalwani (2018) zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen dem IDO-Metabolismus und dem BMI. Die Gruppen dieser Studie haben sich allerdings im Hinblick auf den BMI nicht signifikant unterschieden, weshalb er vermutlich keinen Einfluss auf die vorgestellten Ergebnisse hat.



**Abbildung 56** Therapeutische Angriffspunkte

### 4.3. Bedeutung für die klinische Praxis

Die Perspektive dieser Arbeit hinsichtlich der klinischen Praxis besteht in der Beurteilung der AIT, der Entdeckung von potentiellen Biomarkern zum Monitoring des allergischen Asthmas sowie der Identifizierung von Angriffspunkten für medikamentöse Therapien.

Die vorgestellten Ergebnisse sprechen für die Empfehlung einer AIT bei Allergikern. Die Studienteilnehmer fühlten sich durch die Symptome der Allergie signifikant weniger belastet. Außerdem zeigte die Gruppe der AA mit AIT ein besser kontrolliertes Asthma und wies eine erhöhte Lebensqualität auf.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es Biomarker zu finden, die dem Monitoring der Erkrankung sowie der Therapie dienen. In der Gruppe der Allergiker konnte eine erhöhte PD-L1-Expression auf Monozyten im Serum gemessen werden. In der Gruppe der AA mit AIT konnte eine erniedrigte Neopterin-Konzentration im Sputum nachgewiesen werden. Diese Expressionsmuster können als potentielle Marker für eine erfolgreiche AIT gewertet werden. Bei positiven Marken kann die AIT gegebenenfalls frühzeitig beendet werden, was für die Patienten eine Erleichterung darstellt.

Die Analyse der Zytokin-Expressionsmuster dient dem Verständnis der Pathomechanismen. Die einzelnen Veränderungen stellen potentielle therapeutische Angriffspunkte dar. Figure 56 gibt eine Übersicht über mögliche Zielstrukturen in der Therapie des allergischen Asthmas.

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Anwendung von IP-10 als therapeutische Zielstruktur in der Therapie des allergischen Asthmas. Auch Pilette et al. (2004) vermuten eine mögliche Hemmung der T-Zell-Infiltration bei Asthma durch die Inhibition von Chemokin-Rezeptoren. Die erhöhten IP-10-Werte in der Gruppe der AA können über eine Aktivierung der TH1-Zellen zur Inflammation beitragen. Eine Hemmung dieser Wirkung trägt möglicherweise zur Kontrolle der asthmatischen Erkrankung bei.

Die Ergebnisse dieser Dissertation unterstützen weiterhin einen möglichen Effekt von Medikamenten im Bereich der PD/PD-L-Achse für die Behandlung der allergischen Inflammation. Antikörper gegen PD-L1 werden als Therapeutika in der Onkologie eingesetzt. Sie bewirken einen dauerhaften Tumorrückgang beim Melanom, kleinzelligen Lungen- und Nierenkarzi-



nom (Brahmer et al., 2012). Wen et al. (2018) zeigten, dass PD-L1 durch M2-ähnliche Makrophagen exprimiert wird. Der Tumor verstärkt diese Expression durch die Produktion von Autophagosomen. Im Gegensatz zur Behandlung von Tumoren, bei der eine Hemmung der PD/PD-L-Achse zwischen Tumor und T-Zellen gezielt erfolgt, wäre im Bereich der Allergologie eine Verstärkung der Achse zur Minderung der TH2- oder TH17-Aktivität zielführend. Die Hemmung von PD-L2 führt zu einer verstärkten bronchialen Inflammation und Hemmung der TH2-Zellen (Matsumoto et al., 2004). Der Ligand PD-L1 führt zu einer herabgesetzten TH17-Immunantwort (McAlees et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese protektive Wirkung der PD-Liganden, da Studienteilnehmer mit AIT eine erhöhte Expression von PD-L1 im Serum aufwiesen. Eine Verstärkung der PD-Liganden stellt einen möglichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung von Asthma dar.

Einen weiteren therapeutischen Ansatz bietet die Beeinflussung der IDO-Aktivität. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine verminderte IDO-Aktivität bei Allergikern im Sputum während der Allergiesaison. Eine erhöhte IDO-Aktivität führt möglicherweise zu einer Minderung der allergischen Symptome. Ein Ansatz zur Steigerung der IDO-Aktivität ist die Blockade der NO-Produktion, da das Enzym IDO durch das Molekül NO gehemmt wird. Die Hemmung der NO-Synthese könnte somit zu einer verstärkten IDO-Aktivität führen, die sich protektiv auf das Lungengewebe auswirken kann (Gostner et al., 2016; von Bubnoff & Bieber, 2012). Ein zweiter Ansatz zur Steigerung der IDO-Aktivität ist die Gabe von Toll-like-Rezeptor-Liganden. Im Mausmodell führten TLR9-Liganden zu einer verstärkten Bildung von IDO. Auf diese Weise werden TH2-Zellen möglicherweise gehemmt und die asthmatische Reaktion herunterreguliert (Hayashi et al., 2004). Eine andere Studie zeigte, dass TLR-7 Agonisten ebenfalls zu einer herabgesetzten Hyperreagibilität der Atemwege und Reduktion der Eosinophilie führen (Lebold, Jacoby & Drake, 2016). Direkte Medikamente in diesen Metabolismen könnten zu einer Einsparung von Kortikosteroiden führen.

Diese Studie liefert wertvolle Ergebnisse bezüglich der Wirkung und des Pathomechanismus der Immuntherapie. Sie unterstützen Ansätze für neue Biomarker und Therapien im Bereich des allergischen Asthmas.

## 5. Zusammenfassung

Als eine der größten Zellpopulationen im respiratorischen Trakt spielen Makrophagen und deren Vorläufer im Blut – Monozyten – eine entscheidende Rolle bei Entzündungen wie dem allergischen Asthma bronchiale. Einerseits dienen die Zellen der primären Abwehr von Pathogenen, andererseits tragen inflammatorisch polarisierte Subgruppen auch zum allergischen Entzündungsprozess bei. Die Untersuchung der Makrophagen und Monozyten stellt einen unerlässlichen Schritt in der Erforschung der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale dar.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren die Vorteile der Durchführung einer allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) bei Allergikern: Die AIT bewirkt eine Verringerung der Symptombelastung, verbesserte Asthmakontrolle sowie eine erhöhte Lebensqualität.

Um ein Abbild des lokalen Inflammationsgeschehens in den Atemwegen zu erhalten, wurde eine Sputuminduktion durchgeführt. Die Analyse der Blut- und Sputumproben diente der Charakterisierung von Monozyten und Makrophagen sowie der Erforschung von Biomarkern und Therapieansätzen beim allergischen Asthma bronchiale.  $CD45^+CD16^-HLA-DR^+$ -Zellen stellen hierbei eine Subgruppe der Monozyten und Makrophagen dar. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der peripheren Blutmonozyten ergaben außerhalb der Allergiesaison eine erhöhte PD-L1-Expression der  $CD45^+CD16^-HLA-DR^+$ -Monozyten der Studienteilnehmer mit AIT im Vergleich zu den Studienteilnehmern ohne AIT. Außerdem wies die Gruppe der Asthmatiker mit AIT erniedrigte Neopterin-Spiegel im Vergleich zu den Asthmatikern ohne AIT auf. Folglich könnten die erhöhte PD-L1-Expression im Serum sowie erniedrigte Neopterin-Spiegel im Sputum als Biomarker für eine erfolgreiche AIT dienen.

Potentielle therapeutische Angriffspunkte stellen das Chemokin IP-10, die PD-Liganden sowie das Enzym IDO dar. Diese Studie konnte außerhalb der Allergiesaison eine verminderte IP-10-Produktion der  $CD45^+CD16^-HLA-DR^+$ -Monozyten sowie -Makrophagen der allergischen Rhinitiker messen. Die Asthmatiker zeigten hingegen eine erhöhte Produktion von IP-10.  $CD45^+CD16^-HLA-DR^+$ -Makrophagen der Studienteilnehmer mit allergischem Asthma wiesen außerdem eine erhöhte Expression der regulatorischen Liganden PD-L1 sowie PD-L2 auf. Die Serum IDO-Aktivität war innerhalb der Allergiesaison bei den Studienteilnehmern ohne AIT vor allem bei den Asthmatikern erhöht. Eine Kontrolle der asthmatischen Entzündung lässt sich möglicherweise durch eine Suppression der Expression von IP-10 und Steigerung der Aktivität der PD-Liganden sowie des IDO-Enzyms erreichen.

Schließlich wurde in dieser Studie die Polarisierung der Makrophagen und Monozyten analysiert: Die Phänotyp-Analyse der  $CD45^+CD16^-HLA-DR^+$ -Zellen zeigte neben den inflammatorischen Eigenschaften einen regulativen Charakter der Zellen auf.

Die Analyse der CD45<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Monozyten und -Makrophagen sowie des Serum- und Sputumüberstands der Allergiker trägt dazu bei, weitere Erkenntnisse über die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale sowie die Wirkweise der AIT zu erlangen. Die Ergebnisse stellen einen Baustein in der Charakterisierung der Phänotypen auf zellulärer Ebene und der Entwicklung von Biomarkern und therapeutischen Ansätzen auf molekularer Ebene bei allergischem Asthma bronchiale dar.


## A. Kongressbeiträge

Greissel, L. S., Gostner, J. M., Pechtold, L. C., Jakwerth, C. A., Gürth, F., Fuchs, D., . . . Zissler, U. M. (2017). Allergen-Specific Immunotherapy in Allergic Asthma Decreased Immune Activation Markers Neopterin, Tryptophan and PD-L1 in Macrophages. In *European Academy of Allergy and Clinical Immunology Conference*, München.

Greissel, L. S., Pechtold, L. C., Jakwerth, C. A., Gürth, F., Schmidt-Weber, C. B., Chaker, A. M. & Zissler, U. M. (2018). M2-like Alveolar Macrophages Express Higher Levels of PD-L1, PD-L2 and IP-10 in Allergic Asthmatic Patients. In *International Severe Asthma Forum*, Madrid.

## B. Studienunterlagen

### B.1. Standardarbeitsanweisung der Sputuminduktion

|   |   |                                   |
|---|---|-----------------------------------|
|  | Zentrum für Allergie und Umwelt<br><b>Arbeitsanweisung</b><br><b>Sputumgewinnung und Aufarbeitung</b> | Dok.Nr. 001<br>Seite 1 von 4      |
|   |   | Version : 01<br>Stand: 01.05.2012 |

#### Sputumgewinnung und Aufarbeitung

Protokoll für Studie \_\_\_\_\_ Sputum induziert durch \_\_\_\_\_  
Titel, Vorname, Nachname

**SPUTUM INDUZIERUNG**

Probanden-Nummer \_\_\_\_\_

Tag der Prozessierung          
Tag            Monat            Jahr

**BASELINE FEV<sub>1</sub>-MESSUNG**

|                     | Messung 1            | Messung 2            | Messung 3            | Höchster Wert        |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                     | FEV <sub>1</sub> (L) | FEV <sub>1</sub> (L) | FEV <sub>1</sub> (L) | FEV <sub>1</sub> (L) |
| Pre-Bronchodilator  |                      |                      |                      |                      |
| Salbutamol          |                      |                      |                      |                      |
| Post-Bronchodilator |                      |                      |                      |                      |

Berechnen Sie den Abfall des FEV<sub>1</sub> um 10% bzw. 20% in Bezug auf den Höchsten Wert [FEV<sub>1</sub> (L)] nach Verabreichung der 400µg Salbutamol.

Post-Bronchodilator FEV<sub>1</sub> Abfall um 10%  .   L

Post-Bronchodilator FEV<sub>1</sub> Abfall um 20%  .   L

**SPUTUM INDUKTION**

|              | Konzentration NaCl | FEV <sub>1</sub> in L | ✓<br>bei Gabe von Salbutamol | Dosis an Salbutamol |
|--------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|
| Inhalation 1 |                    |                       |                              |                     |
| Inhalation 2 |                    |                       |                              |                     |
| Inhalation 3 |                    |                       |                              |                     |

Begründung für Abweichungen vom Protokoll:

Dokumentationen von unerwünschten Ereignissen:

Dokumentation von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen:

### Sputumgewinnung und Aufarbeitung

Protokoll für Studie \_\_\_\_\_ Sputum aufbereitet durch \_\_\_\_\_  
Titel, Vorname, Nachname

---

**SPUTUM AUFBEREITUNG**

---

Probanden-Nummer \_\_\_\_\_

Tag der Prozessierung               

Tag      Monat      Jahr

---

**PRE-PROZESSIERUNG DER SPUTUMPROBE**

|  |   |   |
|--|---|---|
| Gesamtgewicht<br>(Gefäß + Probe)<br><b>A</b> | Gewicht des leeren Gefäßes<br>(Gefäß)<br><b>B</b> | Gewicht des Sputums<br><b>C = (A – B)</b> |
| Gramm  | Gramm   | Gramm                                     |

---

**QUALITÄT DER SPUTUMPROBE**

Notieren Sie bitte die folgenden visuellen Beobachtungen, die Farbe und die Eigenschaften.

Mucoid\*   
  Muco-purulent\*\*   
  Purulent\*\*\*   
  Blut / Fremdmaterial\*\*\*\*

\* schleimig    \* schleimig mit Eiteranteil    \*\*\* eitrig    \*\*\*\* z.B. Essensreste, Zahnfüllungen, ect.

---

**GEWICHT DES SELEKTIERTEN SPUTUMS**

|  |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|
| GEWICHT DES<br>LEEREN SPU-<br>TUMGEFÄSSE<br><b>S</b><br><b>D</b> | GEWICHT DES<br>GEFÄSSES +<br>SPUTUM<br><b>E</b> | GEWICHT DES<br>SELEKTIERTE<br>N SPUTUMS<br><b>F = (E – D)</b> | VOLUMEN AN<br>DTT<br>HINZUGEFGT<br><b>4 x F</b> | VOLUMEN AN<br>PBS<br>HINZUGEFGT<br><b>2 x F</b> |
| Gramm  | Gramm   | Gramm   | mL  | mL  |

---

**FILTRIERTES VOLUMEN**

|   |  |   |                                     |
|---|--|---|-------------------------------------|
| GEWICHT DES<br>LEEREN<br>GEFÄSSES<br><b>G</b> | GEWICHT<br>GEFÄSS +<br>FILTRAT<br><b>H</b> | GEWICHT DES<br>FILTRATS<br><b>I = (H – G)</b> | VOLUMEN DES<br>FILTRATS<br><b>I</b> |
| Gramm   | Gramm                                      | Gramm   | mL                                  |

### Sputungewinnung und Aufarbeitung

Probanden-Nummer \_\_\_\_\_

Tag der Prozessierung               

Tag      Monat      Jahr

---

**ZELLZÄHLUNG**

Zählen Sie die 4 Quadranten in der Neugebauer-Zählkammer.

|   | Non-squamöse Zellen | Non-squamöse Zellen | Squamöse Zellen |
|---|---------------------|---------------------|-----------------|
|   | Lebende Leukozyten  | Tote Leukozyten     |                 |
| <b>Gesamtwert (alle 4 Quadranten)</b>     |                     |                     |                 |
| <b>Durchschnittswert (Gesamtwert / 4)</b> |                     |                     |                 |

|                     | Leukozyten Zählung pro mL <sup>1)</sup><br>10 <sup>4</sup> Zellen/mL | Squamöse Zellen <sup>2)</sup><br>% | Lebende Leukozyten <sup>3)</sup><br>% | Gesamt-Leukozyten <sup>4)</sup><br>10 <sup>6</sup> Zellen |
|---------------------|--|------------------------------------|---------------------------------------|---|
| <b>Durchschnitt</b> |  |                                    |                                       |   |

<sup>1)</sup> Leukozyten-Zählung (10<sup>4</sup> Zellen/mL) = Durchschnitt (Lebende + Tote Leukozyten) x 2 (1:2 Verd. mit Tryp.blau)

<sup>2)</sup> Squamöse Zellen % = (Gesamtwert Squamöse) / (Gesamtleukozyten (lebende + tote) + Gesamtwert Squamöse Zellen) x 100

<sup>3)</sup> Lebende Leukozyten % = (Gesamtwert lebende Leukozyten) / (Gesamtwert lebende Leukozyten + Gesamtwert tote Leukozyten) x 100

<sup>4)</sup> Gesamt-Leukozyten = [Leukozyten-Zählung (10<sup>4</sup> Zellen/mL x Volumen des Filtrats (mL))] / 100

---

**RESUSPENSIONSVOLUMEN (X) FÜR ZYTOSPIN**

Resuspensions-Volumen :    .   mL

Berechnung : Gesamt-Leukozyten (10<sup>6</sup> Zellen) / (0.5 x 10<sup>6</sup>) = Resuspensions-Volumen

**Sputumgewinnung und Aufarbeitung**

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
| Protokoll für Studie _____   |   |   |  |
| <b>SPUTUM ZUSAMMENFASSUNG</b>  |   |   |  |
| Probanden-Nummer _____   |   |   |  |
| Tag der Prozessierung  |   |   |  |
| <input type="text"/> <input type="text"/>  | <input type="text"/> <input type="text"/>                                   | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |  |
| Tag  | Monat   | Jahr  |  |
| Sputum induziert durch _____   |   |   |  |
| Sputum aufgearbeitet durch _____   |   |   |  |
| <b>SPUTUMPROBEN</b>  |   |   |  |
| <b>Probennahme:</b>  |   | <b>Anzahl der Proben</b>  |  |
| Lungenfunktionsdaten   | <input type="checkbox"/> vorhanden <input type="checkbox"/> nicht vorhanden |   |  |
| Induziertes Sputum   | <input type="checkbox"/> vorhanden <input type="checkbox"/> nicht vorhanden |   |  |
| Überstände   | <input type="checkbox"/> vorhanden <input type="checkbox"/> nicht vorhanden | <input type="text"/>  |  |
| Zytospin-Präparate   | <input type="checkbox"/> vorhanden <input type="checkbox"/> nicht vorhanden | <input type="text"/>  |  |
| RNA-Proben   | <input type="checkbox"/> vorhanden <input type="checkbox"/> nicht vorhanden | <input type="text"/>  |  |
| Differentialzellzählung:   |   |   |  |
| ___% Makrophagen; ___% Lymphozyten; ___% Neutrophile; ___% Eosinophile; ___% Basophile |   |   |  |
| Begründung für Abweichung vom Protokoll:   |   |   |  |
| _____<br>Datum, Unterschrift (Induktion)   |   | _____<br>Datum, Unterschrift (Aufarbeitung)   |  |



## B.2. Fragebogen zum subjektiven Belastungsempfinden

PSQ20 W4<sup>1</sup>

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        |

<sup>1</sup> 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.

## B.3. Kleiner Rhinokonjunktivitis-Lebensqualitätsfragebogen

Patientennummer:

Datum:

Mini Rhinitis Quality of Life Questionnaire (deutsche Version)

| <b>Waren Sie in der letzten Woche aufgrund Ihrer aktuellen Beschwerden in den folgenden Tätigkeiten eingeschränkt?</b>                                       |           |      |       |       |          |      |        |
|--|-----------|------|-------|-------|----------|------|--------|
|  | 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      |
| <b>Wie stark litten Sie in der letzten Woche aufgrund Ihrer aktuellen Beschwerden unter folgenden Problemen?</b>   |           |      |       |       |          |      |        |
|  | 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      |

# Literatur

- Abeles, R. D., McPhail, M. J., Sowter, D., Antoniadou, C. G., Vergis, N., Vijay, G. K. M., ... Vergani, D. (2012). CD14, CD16 and HLA-DR Reliably Identifies Human Monocytes and Their Subsets in the Context of Pathologically Reduced HLA-DR Expression by CD14hi/CD16neg Monocytes: Expansion of CD14hi/CD16pos and Contraction of CD14lo/CD16pos Monocytes in Acute Liver Fail. *Cytometry Part A*, 81(10), 823–834.
- Abramson, M. J., Puy, R. M. & Weiner, J. M. (2010). Injection Allergen Immunotherapy for Asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8).
- Akbari, O., Stock, P., Singh, A. K., Lombardi, V., Lee, W.-L., Freeman, G. J., ... DeKruyff, R. H. (2010). PD-L1 and PD-L2 Modulate Airway Inflammation and iNKT-Cell-Dependent Airway Hyperreactivity in Opposing Directions. *Mucosal Immunology*, 3(1), 81–91.
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M. & Akdis, C. A. (2012). TH17 and TH22 Cells: A Confusion of Antimicrobial Response with Tissue Inflammation versus Protection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(6), 1438–1449.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L. T., Dimitriu, P. A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., ... Brett Finlay, B. (2015). Early Infancy Microbial and Metabolic Alterations Affect Risk of Childhood Asthma. *Science Translational Medicine*, 7(307), 307ra152.
- Asher, M. I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K. & Williams, H. (2006). Worldwide Time Trends in the Prevalence of Symptoms of Asthma, Allergic Rhinoconjunctivitis, and Eczema in Childhood: ISAAC Phases One and Three Repeat Multicountry Cross-Sectional Surveys. *The Lancet*, 368(9537), 733–743.
- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H. & Williams, K. C. (2010). Evaluation of a 12-Color Flow Cytometry Panel to Study Lymphocyte, Monocyte, and Dendritic Cell Subsets in Humans. *Cytometry Part A*, 77, 410–419.
- Averbeck, M., Gebhardt, C., Emmrich, F., Treudler, R. & Simon, J. C. (2007). Immunologic Principles of Allergic Disease. *JDDG*, 5(11), 1015–1027.
- Bachert, C., Borchard, U., Bettina Wedi, Klimek, L., Rasp, G., Riechelmann, H., ... Ring, J. (2006). Allergische Rhinokonjunktivitis Leitlinie Der DGAI in Abstimmung Mit Der DDG. *JDDG*, 4(3), 264–275.
- Badawy, A. (2017). Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *International Journal of Tryptophan Research*, 10, 1–20.
- Baines, K. J., Simpson, J. L., Wood, L. G., Scott, R. J., Fibbens, N. L., Powell, H., ... Gibson, P. G. (2014). Sputum Gene Expression Signature of 6 Biomarkers Discriminates Asthma Inflammatory Phenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(4), 997–1007.
- Ballardini, N., Bergström, A., Wahlgren, C.-F., van Hage, M., Hallner, E., Kull, I., ... Wickman, M. (2016). IgE Antibodies in Relation to Prevalence and Multimorbidity of Eczema, Asthma, and Rhinitis from Birth to Adolescence. *Allergy*, 71(3), 342–349.
- Becton, Dickinson and Company. (2015). BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Heparin. Becton, Dickinson and Company.

- Behringer, V., Stevens, J. M. G., Leendertz, F. H., Hohmann, G. & Deschner, T. (2017). Validation of a Method for the Assessment of Urinary Neopterin Levels to Monitor Health Status in Non-Human-Primate Species. *Frontiers in Physiology*, 8, 51.
- Björkstén, B., Clayton, T., Ellwood, P., Stewart, A. & Strachan, D. (2008). Worldwide Time Trends for Symptoms of Rhinitis and Conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19(2), 110–124.
- Bochner, B. S., Hudson, S. A., Xiao, H. Q. & Liu, M. C. (2003). Release of Both CCR4-Active and CXCR3-Active Chemokines during Human Allergic Pulmonary Late-Phase Reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(5), 930–934.
- Boorsma, C. E., Draijer, C. & Melgert, B. N. (2013). Macrophage Heterogeneity in Respiratory Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–19.
- Bousquet, J., Vignola, A. M. & Demoly, P. (2003). Links between Rhinitis and Asthma. *Allergy*, 58(8), 691–706.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., . . . Wigginton, J. M. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–2465.
- Braun-Fahrländer, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., . . . von Mutius, E. (2002). Environmental Exposure to Endotoxin and Its Relation to Asthma in School-Age Children. *New England Journal of Medicine*, 347(12), 869–877.
- Brożek, J. L., Bousquet, J., Agache, I., Agarwal, A., Bachert, C., Bosnic-Anticevich, S., . . . Schünemann, H. J. (2017). Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) Guidelines—2016 Revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 950–958.
- Buhl, R., Bals, R., Baur, X., Berdel, D., Criée, C.-P., Gappa, M., . . . Hamelmann, E. (2017). S2k-Leitlinie Zur Diagnostik Und Therapie von Patienten Mit Asthma. *Pneumologie*, 71(12), 849–919.
- Bundesärztekammer, Bundesvereinigung, K. & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. (2020). NVL Asthma – Langfassung, 4. Auflage. Version 1.
- Busmann, C., Xia, J., Allam, J.-P., Maintz, L., Bieber, T. & Novak, N. (2010). Early Markers for Protective Mechanisms during Rush Venom Immunotherapy. *Allergy*, 65(12), 1558–1565.
- Buyuktiryaki, B., Sahiner, U. M., Girgin, G., Birben, E., Soyer, O. U., Cavkaytar, O., . . . Sackesen, C. (2016). Low Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Persistent Food Allergy in Children. *Allergy*, 71(2), 258–266.
- Calderón, M. A., Linneberg, A., Kleine-Tebbe, J., De Blay, F., Hernandez Fernandez de Rojas, D., Virchow, J. C. & Demoly, P. (2015). Respiratory Allergy Caused by House Dust Mites: What Do We Really Know? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 38–48.
- Campbell, D., Gangur, V., Simons, F. E. R. & HayGlass, K. T. (2004). Allergic Humans Are Hypo-responsive to CXCR3 Chemokines in a Th1 Immunity-promoting Loop. *The FASEB Journal*, 18(2), 1–19.

- Cardell, L.-O., Olsson, P., Andersson, M., Welin, K.-O., Svensson, J., Tennvall, G. R. & Hellgren, J. (2016). TOTALL: High Cost of Allergic Rhinitis—a National Swedish Population-Based Questionnaire Study. *npj Primary Care Respiratory Medicine*, 26, 15082.
- Castro, M., Zangrilli, J., Wechsler, M. E., Bateman, E. D., Brusselle, G. G., Bardin, P., . . . Korn, S. (2015). Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma with Elevated Blood Eosinophil Counts: Results from Two Multicentre, Parallel, Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trials. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(5), 355–366.
- Ciprandi, G., De Amici, M., Berardi, L., Vignini, M., Caimmi, S., Marseglia, A., . . . Fuchs, D. (2011). Serum Neopterin Levels in Spontaneous Urticaria and Atopic Dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(1), 85–87.
- Ciprandi, G., De Amici, M., Marseglia, G. & Fuchs, D. (2010). Sublingual Immunotherapy May Affect Serum Neopterin: Preliminary Findings. *International Immunopharmacology*, 10(11), 1474–1476.
- Ciprandi, G., Silvestri, M. & Sivestri, M. (2014). Serum Specific IgE: A Biomarker of Response to Allergen Immunotherapy. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 24(1), 35–39.
- Clark, N. A., Demers, P. A., Karr, C. J., Koehoorn, M., Lencar, C., Tamburic, L. & Brauer, M. (2010). Effect of Early Life Exposure to Air Pollution on Development of Childhood Asthma. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 284–290.
- Cosmi, L., Santarlaschi, V., Angeli, R., Liotta, F., Maggi, L., Frosali, F., . . . Maggi, E. (2006). Sublingual Immunotherapy with Dermatophagoides Monomeric Allergoid Down-Regulates Allergen-Specific Immunoglobulin E and Increases Both Interferon-Gamma- and Interleukin-10-Production. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(3), 261–272.
- D’Amato, G., Vitale, C., Rosario, N., Neto, H. J. C., Chong-Silva, D. C., Mendonça, F., . . . D’Amato, M. (2017). Climate Change, Allergy and Asthma, and the Role of Tropical Forests. *World Allergy Organization Journal*, 10, 11.
- Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V. K. & Anderson, A. C. (2008). Role of Th1 and Th17 Cells in Organ-Specific Autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 31(3), 252–256.
- Davidson, W. J., The, S. & Leigh, R. (2013). Establishing a Normal Range for Induced Sputum Cell Counts in Western Canada. *Canadian Respiratory Journal*, 20(6), 424–428.
- Dayyani, F., Belge, K.-U., Frankenberger, M., Mack, M., Berki, T. & Ziegler-Heitbrock, L. (2003). Mechanism of Glucocorticoid-Induced Depletion of Human CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(1), 33–39.
- de Roock, S., Hoeks, S. B., Meurs, L., Steur, A., Hoekstra, M. O., Prakken, B. J., . . . de Kleer, I. M. (2011). Critical Role for Programmed Death 1 Signaling and Protein Kinase B in Augmented Regulatory T-Cell Induction in Cord Blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(6), 1369–1371.
- Deppong, C., Juehne, T. I., Hurchla, M., Friend, L. D., Shah, D. D., Rose, C. M., . . . Green, J. M. (2006). Cutting Edge: B and T Lymphocyte Attenuator and Programmed Death Receptor-1 Inhibitory Receptors Are Required for Termination of Acute Allergic Airway Inflammation. *The Journal of Immunology*, 176(7), 3909–3913.

- Dhami, S., Kakourou, A., Asamoah, F., Agache, I., Lau, S., Jutel, M., . . . Sheikh, A. (2017). Allergen Immunotherapy for Allergic Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Allergy*, 72(12), 1825–1848.
- Dold, S., Wjst, M., von Mutius, E., Reitmeir, P. & Stiepel, E. (1992). Genetic Risk for Asthma, Allergic Rhinitis, and Atopic Dermatitis. *Archives of Disease in Childhood*, 67(8), 1018–1022.
- Dörner, K. (2013). Leukocyten und Differenzialblutbild. In *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie* (Eighth).
- Draijer, C., Boorsma, C. E., Robbe, P., Timens, W., Hylkema, M. N., Ten Hacken, N. H., . . . Melgert, B. N. (2017). Human Asthma Is Characterized by More IRF5+ M1 and CD206+ M2 Macrophages and Less IL-10+ M2-like Macrophages around Airways Compared with Healthy Airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(1), 280–283.
- Draijer, C. & Peters-Golden, M. (2017). Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: The Forgotten Cell Awakes. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(2), 12.
- Draijer, C., Robbe, P., Boorsma, C. E., Hylkema, M. N. & Melgert, B. N. (2013). Characterization of Macrophage Phenotypes in Three Murine Models of House-Dust-Mite-Induced Asthma. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–10.
- Draxler, D., Madondo, M., Hanafi, G., Plebanski, M. & Medcalf, R. (2017). A Flowcytometric Analysis to Efficiently Quantify Multiple Innate Immune Cells and T Cell Subsets in Human Blood. *Cytometry Part A*, 91(4), 336–350.
- Eriksson, N. E., Werner, S., Foucard, T., Möller, C., Berg, T., Kiviloog, J., . . . Wihl, J.-Å. (2003). Self-Reported Hypersensitivity to Exotic Fruit in Birch Pollen-Allergic Patients. *Allergology International*, 52(4), 199–206.
- Erin, E. M., Zacharasiewicz, A. S., Nicholson, G. C., Tan, A. J., Higgins, L. A., Williams, T. J., . . . Hansel, T. T. (2005). Topical Corticosteroid Inhibits Interleukin-4, -5 and -13 in Nasal Secretions Following Allergen Challenge. *Clinical and Experimental Allergy*, 35(12), 1608–1614.
- Filanowicz, M., Szykiewicz, E., Cegła, B. & Bartuzi, Z. (2016). Analysis of the Quality of Life of Patients with Asthma and Allergic Rhinitis after Immunotherapy. *Advances in Dermatology and Allergology*, 2, 134–141.
- Firoz, C. K., Jabir, N. R., Kamal, M. A., Alama, M. N., Damanhour, G. A., Khan, W., . . . Tabrez, S. (2015). Neopterin: An Immune Biomarker of Coronary Artery Disease and Its Association with Other CAD Markers. *IUBMB Life*, 67(6), 453–459.
- Fliege, H., Rose, M., Arck, P., Levenstein, S. & Klapp, B. F. (2001). Validierung des "Perceived Stress Questionnaire" (PSQ) an einer deutschen Stichprobe. *Diagnostica*, 47(3), 142–152.
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K. & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 Regulates the Development, Maintenance, and Function of Induced Regulatory T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3015–3029.
- Fritsche, O. (2013). *Physik für Biologen und Mediziner*.

- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U. & Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-Derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine*, 196(4), 459–468.
- Fuchs, D., Shearer, G. M., Boswell, R. N., Clerici, M., Reibnegger, G., Werner, E. R., . . . Wachter, H. (2008). Increased Serum Neopterin in Patients with HIV-1 Infection Is Correlated with Reduced in Vitro Interleukin-2 Production. *Clinical & Experimental Immunology*, 80(1), 44–48.
- Gey, M. H. (2015). *Instrumentelle Analytik Und Bioanalytik* (Third).
- Gieseg, S., Baxter-Parker, G. & Lindsay, A. (2018). Neopterin, Inflammation, and Oxidative Stress: What Could We Be Missing? *Antioxidants*, 7(7), 80.
- Glatzer, F., Mommert, S., Köther, B., Gschwandtner, M., Stark, H., Werfel, T. & Gutzmer, R. (2014). Histamine Downregulates the Th1-Associated Chemokine IP-10 in Monocytes and Myeloid Dendritic Cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 163(1), 11–19.
- Global Initiative for Asthma. (2020). Global Strategy for Asthma Management and Prevention.
- Gostner, J. M., Becker, K., Kofler, H., Strasser, B. & Fuchs, D. (2016). Tryptophan Metabolism in Allergic Disorders. *International Archives of Allergy and Immunology*, 169(4), 203–215.
- Grage-Griebenow, E., Flad, H.-D. & Ernst, M. (2001). Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(1), 11–20.
- Graham-Rowe, D. (2011). When Allergies Go West. *Nature*, 479(7374), 2–4.
- Groh, N., von Loetzen, C. S., Subbarayal, B., Möbs, C., Vogel, L., Hoffmann, A., . . . Schiller, D. (2017). IgE and Allergen-Specific Immunotherapy-Induced IgG 4 Recognize Similar Epitopes of Bet v 1, the Major Allergen of Birch Pollen. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(5), 693–703.
- Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., . . . Puccetti, P. (2007). Reverse Signaling through GITR Ligand Enables Dexamethasone to Activate IDO in Allergy. *Nature Medicine*, 13(5), 579–586.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W.-J., Kefford, R., . . . Ribas, A. (2013). Safety and Tumor Responses with LAMBROLIZUMAB (Anti-PD-1) in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 369(2), 134–144.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-Producing CD4+ Effector T Cells Develop via a Lineage Distinct from the T Helper Type 1 and 2 Lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132.
- Haus, E. & Smolensky, M. H. (1999). Biologic Rhythms in the Immune System. *Chronobiology International*, 16(5), 581–622.
- Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., . . . Raz, E. (2004). Inhibition of Experimental Asthma by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 270–279.

- Hermann-Kunz, E. (2000). Allergische Krankheiten in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 43, 400–406.
- Hoefel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., ... Ginhoux, F. (2015). C-Myb<sup>+</sup> Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 42(4), 665–678.
- Hoffmann, G., Wirleitner, B. & Fuchs, D. (2003). Potential Role of Immune System Activation-Associated Production of Neopterin Derivatives in Humans. *Inflammation Research*, 52(8), 313–321.
- Huber, C., Batchelor, J. R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser, D., ... Wachter, H. (1984). Immune Response-Associated Production of Neopterin. Release from Macrophages Primarily under Control of Interferon-Gamma. *The Journal of Experimental Medicine*, 160(1), 310–316.
- Hung, C.-H., Suen, J.-L., Hua, Y.-M., Chiang, W., Chang, H.-C., Chen, C.-N. & Jong, Y.-J. (2007). Suppressive Effects of Ketotifen on Th1- and Th2-Related Chemokines of Monocytes. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18(5), 378–384.
- Hussell, T. & Bell, T. J. (2014). Alveolar Macrophages: Plasticity in a Tissue-Specific Context. *Nature Reviews Immunology*, 14(2), 81–93.
- Italiani, P. & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5.
- Jacobsen, L., Niggemann, B., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Høst, A., ... Möller, C. (2007). Specific Immunotherapy Has Long-Term Preventive Effect of Seasonal and Perennial Asthma: 10-Year Follow-up on the PAT Study. *Allergy*, 62(8), 943–948.
- Juniper, Thompson, Ferrie & Roberts. (2000). Development and Validation of the Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(1), 132–140.
- Kardos, P., Dinh, Q., Fuchs, K.-H., Gillissen, A., Klimek, L., Koehler, M., ... Worth, H. (2019). Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von erwachsenen Patienten mit Husten. *Pneumologie*, 73(03), 143–180.
- Katila, H., Cantell, K., Appelberg, B. & Rimón, R. (1993). Is There a Seasonal Variation in the Interferon-Producing Capacity of Healthy Subjects? *Journal of Interferon Research*, 13(3), 233–234.
- Kharitonov, S. A., Rajakulasingam, K., O'Connor, B., Durham, S. R. & Barnes, P. J. (1997). Nasal Nitric Oxide Is Increased in Patients with Asthma and Allergic Rhinitis and May Be Modulated by Nasal Glucocorticoids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(1), 58–64.
- Kim, H. Y., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. (2010). The Many Paths to Asthma: Phenotype Shaped by Innate and Adaptive Immunity. *Nature Immunology*, 11(7), 577–584.
- Kleiveland, C. R. (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Hrsg.), *The Impact of Food Bioactives on Health* (S. 161–167).



- Klimek, L., Bachert, C., Pfaar, O., Becker, S., Bieber, T., Brehler, R., . . . Bousquet, J. (2019). ARIA Guideline 2019: Treatment of Allergic Rhinitis in the German Health System. *Allergologie select*, 3(01), 22–50.
- Kowal, K., Moniuszko, M., Dabrowska, M. & Bodzenta-Lukaszyk, A. (2012). Allergen Challenge Differentially Affects the Number of Circulating Monocyte Subsets. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(5), 531–539.
- Lai, S.-T., Hung, C.-H., Hua, Y.-M., Hsu, S.-H., Jong, Y.-J. & Suen, J.-L. (2008). T-Helper 1-Related Chemokines in the Exacerbation of Childhood Asthma. *Pediatrics International*, 50(1), 99–102.
- Lambrecht, B. N. & Hammad, H. (2015). The Immunology of Asthma. *Nature Immunology*, 16(1), 45–56.
- Langen, U., Schmitz, R. & Steppuhn, H. (2013). Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 698–706.
- Lau, S., Falkenhorst, G., Weber, A., Werthmann, I., Lind, P., Buettnergoetz, P. & Wahn, U. (1989). High Mite-Allergen Exposure Increases the Risk of Sensitization in Atopic Children and Young Adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 84(5), 718–725.
- Lay, J. C., Peden, D. B. & Alexis, N. E. (2011). Flow Cytometry of Sputum: Assessing Inflammation and Immune Response Elements in the Bronchial Airways. *Inhalation Toxicology*, 23(7), 392–406.
- Lebold, K. M., Jacoby, D. B. & Drake, M. G. (2016). Toll-like Receptor 7-Targeted Therapy in Respiratory Disease. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(2), 114–119.
- Lee, Y. G., Jeong, J. J., Nyenhuis, S., Berdyshev, E., Chung, S., Ranjan, R., . . . Park, G. Y. (2015). Recruited Alveolar Macrophages, in Response to Airway Epithelial-Derived Monocyte Chemoattractant Protein 1/CCL2, Regulate Airway Inflammation and Remodeling in Allergic Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 52(6), 772–784.
- Lewkowich, I. P., Lajoie, S., Stoffers, S. L., Suzuki, Y., Richgels, P. K., Dienger, K., . . . Wills-Karp, M. (2013). PD-L2 Modulates Asthma Severity by Directly Decreasing Dendritic Cell IL-12 Production. *Mucosal Immunology*, 6(4), 728–739.
- Licari, A., Fuchs, D., Marseglia, G. & Ciprandi, G. (2019). Tryptophan Metabolic Pathway and Neopterin in Asthmatic Children in Clinical Practice. *Italian Journal of Pediatrics*, 45(1), 114.
- Lloyd, C. M. & Hessel, E. M. (2010). Functions of T Cells in Asthma: More than Just TH2 Cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 838–848.
- Lohia, S., Schlosser, R. J. & Soler, Z. M. (2013). Impact of Intranasal Corticosteroids on Asthma Outcomes in Allergic Rhinitis: A Meta-Analysis. *Allergy*, 68(5), 569–579.
- Luukkainen, A., Karjalainen, J., Honkanen, T., Lehtonen, M., Paavonen, T. & Toppila-Salmi, S. (2011). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Patients with Allergic Rhinitis: A Case-Control Study. *Clinical and Translational Allergy*, 1(1), 17.

- Luukkainen, A., Karjalainen, J., Hurme, M., Paavonen, T., Huhtala, H. & Toppila-Salmi, S. (2014). Relationships of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity and Cofactors with Asthma and Nasal Polyps. *American Journal of Rhinology & Allergy*, *28*(1), 5–10.
- Mallmann, N. H., Lima, E. S. & Lalwani, P. (2018). Dysregulation of Tryptophan Catabolism in Metabolic Syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, *16*(3), 135–142.
- Mamessier, E., Milhe, F., Guillot, C., Birnbaum, J., Dupuy, P., Lorec, A.-M., . . . Magnan, A. (2007). T-Cell Activation in Occupational Asthma and Rhinitis. *Allergy*, *62*(2).
- Maneechotesuwan, K., Supawita, S., Kasetsinsombat, K., Wongkajornsilp, A. & Barnes, P. J. (2008). Sputum Indoleamine-2, 3-Dioxygenase Activity Is Increased in Asthmatic Airways by Using Inhaled Corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(1), 43–50.
- Marogna, M., Spadolini, I., Massolo, A., Canonica, G. W. & Passalacqua, G. (2010). Long-Lasting Effects of Sublingual Immunotherapy According to Its Duration: A 15-Year Prospective Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(5), 969–975.
- Matsumoto, K., Inoue, H., Nakano, T., Tsuda, M., Yoshiura, Y., Fukuyama, S., . . . Nakanishi, Y. (2004). B7-DC Regulates Asthmatic Response by an IFN- $\gamma$ -Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, *172*(4), 2530–2541.
- McAlees, J. W., Lajoie, S., Dienger, K., Sproles, A. A., Richgels, P. K., Yang, Y., . . . Lewkowich, I. P. (2015). Differential Control of CD4 + T-Cell Subsets by the PD-1/PD-L1 Axis in a Mouse Model of Allergic Asthma. *European Journal of Immunology*, *45*(4), 1019–1029.
- McCarthy, N. E., Jones, H. A., Marks, N. A., Shiner, R. J., Ind, P. W., Al-Hassi, H. O., . . . Stagg, A. J. (2007). Inhaled Allergen-Driven CD1c up-Regulation and Enhanced Antigen Uptake by Activated Human Respiratory-Tract Dendritic Cells in Atopic Asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, *37*(1), 72–82.
- Medoff, B. D., Sauty, A., Tager, A. M., Maclean, J. A., Smith, R. N., Mathew, A., . . . Luster, A. D. (2002). IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10 (CXCL10) Contributes to Airway Hyperreactivity and Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma. *The Journal of Immunology*, *168*(10), 5278–5286.
- Melgert, B. N., ten Hacken, N. H., Rutgers, B., Timens, W., Postma, D. S. & Hylkema, M. N. (2011). More Alternative Activation of Macrophages in Lungs of Asthmatic Patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(3), 831–833.
- Melichar, B., Spisarová, M., Bartoušková, M., Krčmová, L. K., Javorská, L. & Študentová, H. (2017). Neopterin as a Biomarker of Immune Response in Cancer Patients. *Annals of Translational Medicine*, *5*(13), 280–280.
- Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J. & Bradfield, C. A. (2010). An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *185*(6), 3190–3198.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, *164*(12), 6166–6173.
- Mohyuddin, H., Georgiou, P., Wadhawan, A., Daue, M. L., Brenner, L. A., Gragnoli, C., . . . Postolache, T. T. (2017). Seasonality of Blood Neopterin Levels in the Old Order Amish. *Pteridines*, *28*(3-4), 163–176.

- Möller, C., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Høst, A., Jacobsen, L., ... Wahn, U. (2002). Pollen Immunotherapy Reduces the Development of Asthma in Children with Seasonal Rhinoconjunctivitis (the PAT-Study). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(2), 251–256.
- Moniuszko, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Kowal, K., Lenczewska, D. & Dabrowska, M. (2009). Enhanced Frequencies of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, but Not CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, Peripheral Blood Monocytes in Severe Asthmatic Patients. *Clinical Immunology*, 130(3), 338–346.
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, 7(1), 145–173.
- Mosser, D. M. & Edwards, J. P. (2008). Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969.
- Munitz, A., Brandt, E. B., Mingler, M., Finkelman, F. D. & Rothenberg, M. E. (2008). Distinct Roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 Receptor 1 and the Type II IL-4 Receptor in Asthma Pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(20), 7240–7245.
- Munn, D. H. & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2,3 Dioxygenase and Metabolic Control of Immune Responses. *Trends in Immunology*, 34(3), 137–143.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A. & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *Journal of Experimental Medicine*, 189(9), 1363–1372.
- Murphy, K. M., Weaver, C. & Janeway, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9. Auflage) (L. Seidler, Übers.). Springer Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum.
- Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B. & Fuchs, D. (2002). Neopterin as a Marker for Immune System Activation. *Current Drug Metabolism*, 3(2), 175–187.
- Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 541–566.
- Murray, P. J. (2018). Immune Regulation by Monocytes. *Seminars in Immunology*, 35, 12–18.
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20.
- Murray, P. J. & Wynn, T. A. (2011). Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737.
- Naessens, T., Vander Beken, S., Bogaert, P., Van Rooijen, N., Lienenklaus, S., Weiss, S., ... Grooten, J. (2012). Innate Imprinting of Murine Resident Alveolar Macrophages by Allergic Bronchial Inflammation Causes a Switch from Hypoinflammatory to Hyperinflammatory Reactivity. *The American Journal of Pathology*, 181(1), 174–184.
- Novak, N., Allam, P., Geiger, E. & Bieber, T. (2002). Characterization of Monocyte Subtypes in the Allergic Form of Atopic Eczema/Dermatitis Syndrome. *Allergy*, 57(10), 931–935.
- Oflazoglu, E., Swart, D. A., Anders-Bartholo, P., Jessup, H. K., Norment, A. M., Lawrence, W. A., ... Fitzpatrick, D. R. (2004). Paradoxical Role of Programmed Death-1 Ligand?2 in Th2 Immune Responses in Vitro and in a Mouse Asthma Model in Vivo. *European Journal of Immunology*, 34(12), 3326–3336.

- Ohura, K., Katona, I. M., Wahl, L. M., Chenoweth, D. E. & Wahl, S. M. (1987). Co-Expression of Chemotactic Ligand Receptors on Human Peripheral Blood Monocytes. *The Journal of Immunology*, 138(8), 2633.
- Ortega, H. G., Liu, M. C., Pavord, I. D., Brusselle, G. G., FitzGerald, J. M., Chetta, A., ... Chanez, P. (2014). Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*, 371(13), 1198–1207.
- Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., ... Grohmann, U. (2011). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is a Signaling Protein in Long-Term Tolerance by Dendritic Cells. *Nature Immunology*, 12(9), 870–878.
- Palomares, F., Gomez, F., Bogas, G., Campo, P., Perkins, J. R., Diaz-Perales, A., ... Mayorga, C. (2018). Immunological Changes Induced in Peach Allergy Patients with Systemic Reactions by Pru p 3 Sublingual Immunotherapy. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(3).
- Pawankar, R., Holgate, S. T., Canonica, G. W., Lockey, R. F. & Blaiss, M. S. (2013). *WAO White Book on Allergy: Update 2013*. World Allergy Organization.
- Pedersen, F., Zissler, U. M., Watz, H., Rabe, K. F., Hohlfeld, J. & Holz, O. (2019). Rating Sputum Cell Quality in Clinical Trials for Asthma and COPD Treatment. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 14, 195–198.
- Pfaar, O., Agache, I., Blay, F., Bonini, S., Chaker, A. M., Durham, S. R., ... Akdis, C. A. (2019). Perspectives in Allergen Immunotherapy: 2019 and Beyond. *Allergy*, 74(108), 3–25.
- Pfaar, O., Bachert, C., Bufe, A., Buhl, R., Ebner, C., Eng, P., ... Kleine-Tebbe, J. (2014). Guideline on Allergen-Specific Immunotherapy in IgE-Mediated Allergic Diseases. *Allergo Journal International*, 23(8), 282–319.
- Piconi, S., Trabattoni, D., Rainone, V., Borgonovo, L., Passerini, S., Rizzardini, G., ... Clerici, M. (2010). Immunological Effects of Sublingual Immunotherapy: Clinical Efficacy Is Associated with Modulation of Programmed Cell Death Ligand 1, IL-10, and IgG4. *The Journal of Immunology*, 185(12), 7723–7730.
- Pilette, C., Francis, J., Till, S. & Durham, S. (2004). CCR4 Ligands Are Up-Regulated in the Airways of Atopic Asthmatics after Segmental Allergen Challenge. *European Respiratory Journal*, 23(6), 876–884.
- Ragusa, F. & Fallahi, P. (2017). IP-10 in Occupational Asthma: Review of the Literature and Case-Control Study. *La Clinica Terapeutica*, 168(2), 151–157.
- Raitala, A., Karjalainen, J., Oja, S. S., Kosunen, T. U. & Hurme, M. (2006). Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Activity Is Lower in Atopic than in Non-Atopic Individuals and Is Enhanced by Environmental Factors Protecting from Atopy. *Molecular Immunology*, 43(7), 1054–1056.
- Refaat, M. M., Abdel Rehim, A. S. M., El-Sayed, H. M., Mohamed, N. A. & Khafagy, A. G. (2015). Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase as a Marker in the Evaluation of Allergic Rhinitis. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 29(5), 329–333.
- Reinberg, A., Schuller, E., Delasnerie, N., Clench, J. & Helary, M. (1977). Circadian and circannual rhythms in the blood (leucocytes, total proteins, IgA, IgG and IgM) of young healthy adults. *La Nouvelle Presse Medicale*, 6(41), 3819–3823.

- Röcker, L., Feddersen, H., Hoffmeister, H. & Junge, B. (1980). Jahreszeitliche Veränderungen diagnostisch wichtiger Blutbestandteile. *Klinische Wochenschrift*, *58*(15), 769–778.
- Roskopf, S., Jahn-Schmid, B., Schmetterer, K. G., Zlabinger, G. J. & Steinberger, P. (2018). PD-1 Has a Unique Capacity to Inhibit Allergen-Specific Human CD4+ T Cell Responses. *Scientific Reports*, *8*.
- Sánchez-Regaña, M., M. (2000). Serum Neopterin as an Objective Marker of Psoriatic Disease Activity. *Acta Dermato-Venereologica*, *80*(3), 185–187.
- Saravia, J., Chapman, N. M. & Chi, H. (2019). Helper T Cell Differentiation. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(7), 634–643.
- Scadding, G. K. (2015). Optimal Management of Allergic Rhinitis. *Archives of Disease in Childhood*, *100*(6), 576–582.
- Schatz, M., Sorkness, C. A., Li, J. T., Marcus, P., Murray, J. J., Nathan, R. A., . . . Jhingran, P. (2006). Asthma Control Test: Reliability, Validity, and Responsiveness in Patients Not Previously Followed by Asthma Specialists. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(3), 549–556.
- Schlaud, M., Atzpodien, K. & Thierfelder, W. (2007). Allergische Erkrankungen: Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, *50*(5-6), 701–710.
- Schmitz, S. (2011). Zellbiologische und Routinemethoden. In *Der Experimentator: Zellkultur* (S. 205–222).
- Shamji, M. H. & Durham, S. R. (2017). Mechanisms of Allergen Immunotherapy for Inhaled Allergens and Predictive Biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(6), 1485–1498.
- Singh, A. K., Stock, P. & Akbari, O. (2011). Role of PD-L1 and PD-L2 in Allergic Diseases and Asthma: Role of PD-1 Ligands in Asthma. *Allergy*, *66*(2), 155–162.
- Sinharoy, A., Mitra, S. & Mondal, P. (2018). Socioeconomic and Environmental Predictors of Asthma-Related Mortality. *Journal of Environmental and Public Health*, *2018*, 1–7.
- Siroux, V., Ballardini, N., Soler, M., Lupinek, C., Boudier, A., Pin, I., . . . Bousquet, J. (2018). The Asthma-Rhinitis Multimorbidity Is Associated with IgE Polysensitization in Adolescents and Adults. *Allergy*, *73*(7), 1447–1458.
- Song, W.-J., Sohn, K.-H., Kang, M.-G., Park, H.-K., Kim, M.-Y., Kim, S.-H., . . . Chang, Y.-S. (2015). Urban–Rural Differences in the Prevalence of Allergen Sensitization and Self-Reported Rhinitis in the Elderly Population. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *114*(6), 455–461.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *176*(1), 287–292.
- Strachan, D. P. (1989). Hay Fever, Hygiene, and Household Size. *BMJ*, *299*(6710), 1259–1260.
- Taher, Y. A., Piavaux, B. J., Gras, R., van Esch, B. C., Hofman, G. A., Bloksma, N., . . . van Oosterhout, A. J. (2008). Indoleamine 2,3-Dioxygenase–Dependent Tryptophan Meta-

- bolites Contribute to Tolerance Induction during Allergen Immunotherapy in a Mouse Model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 983–991.
- Takaku, Y., Soma, T., Uchida, Y., Kobayashi, T., Nakagome, K. & Nagata, M. (2016). CXC Chemokine Superfamily Induced by Interferon- $\gamma$  in Asthma: A Cross-Sectional Observational Study. *Asthma Research and Practice*, 2(1), 6.
- Universität-Salzburg. (2020). Grundlagen Der Durchflusszytometrie. [http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle\\_file\\_imports/2081233.pdf](http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/2081233.pdf).
- Upham, J. W. & Stumbles, P. A. (2003). Why Are Dendritic Cells Important in Allergic Diseases of the Respiratory Tract? *Pharmacology & Therapeutics*, 100(1), 75–87.
- van der Sluijs, K. F., van de Pol, M. A., Kulik, W., Dijkhuis, A., Smids, B. S., van Eijk, H. W., ... Lutter, R. (2013). Systemic Tryptophan and Kynurenine Catabolite Levels Relate to Severity of Rhinovirus-Induced Asthma Exacerbation: A Prospective Study with a Parallel-Group Design. *Thorax*, 68(12), 1122–1130.
- van Furth, R. & Cohn, Z. A. (1968). The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 128(3), 415–435.
- Veremeyko, T., Siddiqui, S., Sotnikov, I., Yung, A. & Ponomarev, E. D. (2013). IL-4/IL-13-Dependent and Independent Expression of miR-124 and Its Contribution to M2 Phenotype of Monocytic Cells in Normal Conditions and during Allergic Inflammation. *PLOS ONE*, 8(12).
- Vidal, S., Bellido-Casado, J., Granel, C., Crespo, A., Plaza, V. & Juárez, C. (2012). Flow Cytometry Analysis of Leukocytes in Induced Sputum from Asthmatic Patients. *Immunobiology*, 217(7), 692–697.
- Virchow, J. C., Backer, V., Kuna, P., Prieto, L., Nolte, H., Villesen, H. H., ... de Blay, F. (2016). Efficacy of a House Dust Mite Sublingual Allergen Immunotherapy Tablet in Adults with Allergic Asthma. *JAMA*, 315(16), 1715.
- von Bubnoff, D. & Bieber, T. (2012). The Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Pathway Controls Allergy. *Allergy*, 67(6), 718–725.
- von Bubnoff, D., Fimmers, R., Bogdanow, M., Matz, H., Koch, S. & Bieber, T. (2004). Asymptomatic Atopy Is Associated with Increased Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity and Interleukin-10 Production during Seasonal Allergen Exposure. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(7), 1056–1063.
- von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M. L., Hanau, D., de la Salle, H. & Bieber, T. (2002). Fc $\epsilon$ RI Induces the Tryptophan Degradation Pathway Involved in Regulating T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 169(4), 1810–1816.
- von Mutius, E. & Vercelli, D. (2010). Farm Living: Effects on Childhood Asthma and Allergy. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 861–868.
- Walker, S. M., Pajno, G. B., Lima, M. T., Wilson, D. R. & Durham, S. R. (2001). Grass Pollen Immunotherapy for Seasonal Rhinitis and Asthma: A Randomized, Controlled Trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(1), 87–93.
- Wang, W., Huang, X., Chen, Z., Zheng, R., Chen, Y., Zhang, G. & Yang, Q. (2016). Prevalence and Trends of Sensitisation to Aeroallergens in Patients with Allergic Rhinitis in Guangzhou, China: A 10-Year Retrospective Study. *BMJ Open*, 6(5).

- Wang, Y., Xiong, L., Yin, X., Wang, J., Zhang, Q., Yu, Z., . . . Kong, W. (2014). House Dust Mite Allergen Levels in Households and Correlation with Allergic Rhinitis Symptoms. *American Journal of Rhinology & Allergy*, *28*(5), 193–196.
- Warwick, G., Thomas, P. S. & Yates, D. H. (2013). Non-Invasive Biomarkers in Exacerbations of Obstructive Lung Disease: Biomarkers in Obstructive Exacerbations. *Respirology*, *18*(5), 874–884.
- Wen, Z.-F., Liu, H., Gao, R., Zhou, M., Ma, J., Zhang, Y., . . . Wang, L.-X. (2018). Tumor Cell-Released Autophagosomes (TRAPs) Promote Immunosuppression through Induction of M2-like Macrophages with Increased Expression of PD-L1. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *6*(1), 151.
- Wenzel, S., Ford, L., Pearlman, D., Spector, S., Sher, L., Skobieranda, F., . . . Pirozzi, G. (2013). Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. *New England Journal of Medicine*, *368*(26), 2455–2466.
- Werchan, M., Werchan, B. & Bergmann, K.-C. (2018). German Pollen Calendar 4.0 – Update Based on 2011–2016 Pollen Data. *Allergo Journal International*, *27*(3), 69–71.
- Werner, E. R., Hirsch-Kauffmann, M., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Schweiger, M. & Wachter, H. (1987). Interferon- $\gamma$ -Induced Degradation of Tryptophan by Human Cells in Vitro. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, *368*(2), 1407–1412.
- Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Yim, J. J., . . . Wachter, H. (1990). Tetrahydrobiopterin Biosynthetic Activities in Human Macrophages, Fibroblasts, THP-1, and T 24 Cells. GTP-Cyclohydrolase I Is Stimulated by Interferon-Gamma, and 6-Pyruvoyl Tetrahydropterin Synthase and Sepiapterin Reductase Are Constitutively Present. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(6), 3189–3192.
- Widner, B., Werner, E. R., Schennach, H., Wachter, H. & Fuchs, D. (1997). Simultaneous Measurement of Serum Tryptophan and Kynurenine by HPLC. *Clinical Chemistry*, *43*(12), 2424–2426.
- Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J. Y., Ong, S. M., Dang, T. M. & Wong, S. C. (2012). The Three Human Monocyte Subsets: Implications for Health and Disease. *Immunologic Research*, *53*(1-3), 41–57.
- Xi, X., Liu, J.-M. & Guo, J.-Y. (2018). Correlation of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway with Treg/Th17 Imbalance from Asthmatic Children. *International Archives of Allergy and Immunology*, *176*(3-4), 255–267.
- Xu, H., Oriss, T. B., Fei, M., Henry, A. C., Melgert, B. N., Chen, L., . . . Ray, A. (2008). Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Lung Dendritic Cells Promotes Th2 Responses and Allergic Inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(18), 6690–6695.
- Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M.-C., Blankenship, D., . . . Banchereau, J. (2012). Macrophages Induce Differentiation of Plasma Cells through CXCL10/IP-10. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(10), 1813–1823.
- Yoshiyama, T., Sugioka, K., Naruko, T., Nakagawa, M., Shirai, N., Ohsawa, M., . . . Ueda, M. (2018). Neopterin and Cardiovascular Events Following Coronary Stent Implantation in Patients with Stable Angina Pectoris. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *25*(11), 1105–1117.

- Zasłona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van Rooijen, N., Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J. J., . . . Peters-Golden, M. (2014). Resident Alveolar Macrophages Suppress While Recruited Monocytes Promote Allergic Lung Inflammation in Murine Models of Asthma. *The Journal of Immunology*, *193*(8), 4245–4253.
- Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D. & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE Evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monocytes as a Third Monocyte Subset. *Blood*, *118*(12), 50–61.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., . . . Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood. *Blood*, *116*(16), 74–80.
- Zissler, U. M. (2012). *Biomarker Der Bronchialen Entzündung Im Induzierten Sputum* (Diss., Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main).
- Zissler, U. M., Jakwerth, C. A., Guerth, F. M., Pechtold, L., Aguilar-Pimentel, J. A., Dietz, K., . . . Chaker, A. M. (2018). Early IL-10 Producing B-Cells and Coinciding Th/Tr17 Shifts during Three Year Grass-Pollen AIT. *EBioMedicine*, *36*, 475–488.
- Zissler, U. M., Ulrich, M., Jakwerth, C. A., Rothkirch, S., Guerth, F., Weckmann, M., . . . Chaker, A. M. (2018). Biomatrix for Upper and Lower Airway Biomarkers in Patients with Allergic Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(6), 1980–1983.
- Zuberbier, T., Lötvall, J., Simoons, S., Subramanian, S. V. & Church, M. K. (2014). Economic Burden of Inadequate Management of Allergic Diseases in the European Union: A GA2LEN Review. *Allergy*, *69*(10), 1275–1279.



# Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber für die Betreuung und die freundliche Zusammenarbeit, die mir die Erstellung der Dissertation ermöglicht hat.

Ich möchte mich herzlich bei meinen Betreuern PD Dr. Adam Chaker, Dr. Ulrich Zißler sowie Dr. Constanze Jakwerth bedanken, die mich für die Immunologie begeistert sowie die Themenfindung und -ausarbeitung unermüdlich unterstützen haben. Durch unsere konstruktiven Gespräche konnte ich mich auf wissenschaftlicher sowie persönlicher Ebene weiterentwickeln.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Laborpartnerin Lisa Pechtold, bei den Mitarbeitern des ZAUM, des Biozentrums Innsbruck sowie der HNO-Klinik der TUM, insbesondere auch bei Prof. Dr. Bier, für die positive, konstruktive Arbeitsgemeinschaft bedanken.

Zuletzt gebührt mein Dank meiner Familie und vor allem meinem Mann, die mir stets uneingeschränkten Rückhalt gegeben haben.