

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

Durchflusszytometrische Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im Sputum und pe-
ripheren Blut

Sandra Petra Helma Rothkirch

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber

2. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 17.10.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die promotionsführende Einrichtung
Fakultät für Medizin am 28.03.2018 angenommen.

Durchflusszytometrische Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im Sputum und peripheren Blut

Sandra Rothkirch



München 2017

Durchflusszytometrische Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im Sputum und peripheren Blut

Sandra Rothkirch

Dissertation
in der Medizin
an der Technischen Universität
München

vorgelegt von
Sandra Rothkirch

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | v |
| Abbildungsverzeichnis | vi |
| Tabellenverzeichnis | ix |
| Zusammenfassung | xi |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Allergische Erkrankungen | 1 |
| 1.1.1 Definition, Häufigkeit und Altersbezug | 1 |
| 1.1.2 Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis | 3 |
| 1.1.3 Handlungsbedarf - Relevanz für die Gesundheitspolitik | 8 |
| 1.1.4 aktuelle Leitlinie - Allergieprävention | 10 |
| 1.1.5 Immuntherapie | 10 |
| 1.2 Sputum | 12 |
| 2 Zielsetzung | 14 |
| 3 Material und Methoden | 15 |
| 3.1 Hilfsmittel | 15 |
| 3.1.1 Geräte | 15 |
| 3.1.2 Programme | 16 |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 3.1.4 Reagenzien | 19 |
| 3.2 Studienteilnehmer | 21 |
| 3.2.1 Ethische Richtlinien | 21 |
| 3.2.2 Charakterisierung der Probanden | 21 |
| 3.3 Klinische Sputum- und Blutgewinnung | 24 |
| 3.4 Labortechnische Aufarbeitung von Sputum- und Blutproben | 26 |
| 3.5 Zellzählung der Sputum- und PBMC-Proben | 28 |
| 3.6 Zytospins | 28 |
| 3.6.1 Herstellung | 28 |
| 3.6.2 Färbung | 29 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.6.3 | Differenzialzellbild | 29 |
| 3.7 | Durchflusszytometrieanalyse | 33 |
| 3.7.1 | Färbung mit Antikörpern | 33 |
| 3.7.2 | Kompensation | 34 |
| 3.7.3 | Antikörperwahl | 35 |
| 3.7.4 | Sputum-Panel | 37 |
| 3.7.5 | PBMC-Panel | 42 |
| 4 | Ergebnisse | 45 |
| 4.1 | Statistische Auswertung | 45 |
| 4.2 | Klinische Daten | 48 |
| 4.2.1 | Sputumqualität | 48 |
| 4.2.2 | Korrelation mit Lungenfunktionsdaten | 50 |
| 4.2.3 | Korrelation mit dem mRQLQ | 51 |
| 4.3 | Durchflusszytometriedaten | 52 |
| 4.3.1 | Allgemeine Ergebnisse | 52 |
| 4.3.2 | Durchflusszytometrische Phänotypisierung von Sputumzellen | 54 |
| 4.3.3 | Durchflusszytometrische Phänotypisierung der PBMCs | 62 |
| 4.4 | Korrelation mit klinischen Daten | 70 |
| 4.4.1 | Korrelation der Ergebnisse mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum | 71 |
| 4.4.2 | Korrelation der Ergebnisse mit der Hauttestung | 72 |
| 4.5 | Auswertung der Zytospins | 75 |
| 5 | Diskussion | 78 |
| 5.1 | Klinische Daten | 78 |
| 5.2 | Durchflusszytometriedaten | 79 |
| 5.2.1 | T-Zellsubpopulationen | 80 |
| 5.2.2 | B-Zellsubpopulationen | 85 |
| 5.3 | Korrelation mit klinischen Daten | 94 |
| | Literaturverzeichnis | 96 |
| | Anhang | 109 |

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|---------------|---|
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin |
| ANOVA | Analysis of variance |
| APC | Allophycocyanin |
| ASIT | Allergen-specific immunotherapy |
| °C | Grad Celsius |
| CD | Cluster of differentiation |
| Cy | Cyclohexyl |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| DTT | Dithiothreitol |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FEV1 | Forced Expiratory-Volume in 1 second; Einsekundenkapazität |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FOXp3 | Forkhead-Box-Protein P3 |
| FSC | engl. Forward Scatter; dt. Vorwärtsstreulicht |
| FVC | Forcierte Vitalkapazität |
| GINA | Global Initiative for Asthma |
| IFN- α | Interferon-alpha |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| Ig- | Immunglobulin- |
| IL- | Interleukin- |
| LPS | Lipopolysaccheride |
| MEF25% | Expiratorischer Fluss bei 25% der forcierten Vitalkapazität |
| MHC II | major histocompatibility complex class 2 |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|--|
| ml | Milliliter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| nm | Nanometer |
| p | engl. p-value von probability; dt. Wahrscheinlichkeit |
| PBMCs | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PE | Phycoerythrin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | revolutions per minute |
| mRQLQ | mini-Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire |
| RR | Blutdruck nach Riva-Rocci |
| RV/TLC | Residualvolumen/Totalkapazität |
| SCIT | Subkutane Immuntherapie |
| SSC | engl. Side Scatter; dt. Seitwärtsstreulicht |
| SOPs | Standard Operating Procedure |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| TH-Zelle | T-Helfer-Zelle |
| WHO | World Health Organisation |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Ausschnitt aus den Prävalenzen (in% gewichtet) und 95% Konfidenzintervallen von Sensibilisierungen gegen 50 Allergene in der deutschen Bevölkerung (DEGS1, n=7025) (Quelle:(Haftenberger et al., 2013)) | 6 |
| 1.2 | Kostenstruktur allergischer Krankheiten 1996 (Quelle: (Wahn & Wichmann, 2000)) | 8 |
| 1.3 | Leistungen und Lasten des Gesundheitssystems durch allergische Erkrankungen am Beispiel der AOK-Versicherten (Quelle: WIdO (Wissenschaftliches Institut der AOK) (Badura et al., 2007)) | 9 |
| 1.4 | Auswirkungen einer subkutanen Immuntherapie (SIT) auf die Immunmodulation (Quelle:(Jacobsen, Wahn & Bilo, 2012)) | 11 |
| 3.1 | Patientenkohorte in-season | 22 |
| 3.2 | Patientenkohorte out-season | 22 |
| 3.3 | Flowchart der Sputuminduktion (Quelle:(Ziβler, 2012)) | 25 |
| 3.4 | Flowchart der Sputumaufbereitung (Quelle:(Ziβler, 2012)) | 27 |
| 3.5 | Auszählmethode der Zytospins | 29 |
| 3.6 | Plattenepithel (1.Bild); Flimmerepithel (2.Bild); Alveolarmakrophage (3.Bild) (Quelle:(Ziβler, 2012)) | 30 |
| 3.7 | neutrophiler Granulozyt (1.Bild); eosinophiler Granulozyt (2.Bild) (Quelle:(Ziβler, 2012)) | 31 |
| 3.8 | basophiler Granulozyt (1.Bild); Lymphozyt (2.Bild) (Quelle:(Ziβler, 2012)) | 31 |
| 3.9 | Beispiel für die allgemeine Gatingstrategie: Sputum | 38 |
| 3.10 | T-Zell-Gatingstrategie: Sputum | 39 |
| 3.11 | B-Zell-Gatingstrategie: Sputum | 41 |
| 3.12 | allgemeine Gatingstrategie: PBMC | 42 |
| 3.13 | T-Zell-Gatingstrategie: PBMC | 43 |
| 3.14 | B-Zell-Gatingstrategie: PBMC | 44 |
| 4.1 | Beispiel der Auswertegraphik | 47 |
| 4.2 | Vergleich der mittleren prozentualen Zellverteilung im aufgereinigten Sputum | 48 |
| 4.3 | a) Vergleich der Gesamtleukozytenzahl | 49 |
| 4.4 | b) Vergleich der Gesamtleukozytenzahl | 49 |
| 4.5 | Vergleich der Gesamtleukozytenzahl mit dem Geschlecht | 50 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.6 | Vergleich der Tiffeneau-Werte in- und out-season | 51 |
| 4.7 | Vergleich der mRQLQ-Werte in- und out-season | 51 |
| 4.8 | Vergleich der absoluten Zellzahlen | 52 |
| 4.9 | Vergleich der relativen Zellzahlen | 53 |
| 4.10 | Relative T-Zellzahlen in- und out-season | 54 |
| 4.11 | Vergleich der T-Zellverteilung in den Subgruppen | 54 |
| 4.12 | Relative T-regulatorische Zellzahlen in- und out-season | 55 |
| 4.13 | Vergleich der T- regulatorischen Zellverteilung in den Subgruppen | 56 |
| 4.14 | Relative Effektorzellzahlen in- und out-season | 56 |
| 4.15 | Vergleich der Effektorzellverteilung in den Subgruppen | 57 |
| 4.16 | Relative B-Zellzahl in- und out-season | 58 |
| 4.17 | Vergleich der B-Zellverteilung in den Subgruppen | 58 |
| 4.18 | Relative Memory B-Zellzahl in- und out-season | 59 |
| 4.19 | Vergleich der Memory B-Zellverteilung in den Subgruppen | 59 |
| 4.20 | Relative CD19+/CD5+ B-Zellzahl in- und out-season | 60 |
| 4.21 | Vergleich der CD19+/CD5+ B-Zellverteilung in den Subgruppen | 60 |
| 4.22 | Relative Plasmazellzahl in- und out-season | 61 |
| 4.23 | mögliche B-regulatorische Zellen in- und out-season | 61 |
| 4.24 | Relative T-Zellzahlen in- und out-season | 62 |
| 4.25 | Vergleich der T-Zellverteilung in den Subgruppen | 63 |
| 4.26 | Relative T-regulatorische Zellzahlen in- und out-season | 63 |
| 4.27 | Vergleich der T- regulatorischen Zellverteilung in den Subgruppen | 64 |
| 4.28 | Relative Effektorzellzahlen in- und out-season | 64 |
| 4.29 | Vergleich der Effektorzellverteilung in den Subgruppen | 65 |
| 4.30 | Relative B-Zellzahl in- und out-season | 65 |
| 4.31 | Vergleich der B-Zellverteilung in den Subgruppen | 66 |
| 4.32 | Relative Memory B-Zellzahl in- und out-season | 66 |
| 4.33 | Vergleich der Memory B-Zellverteilung in den Subgruppen | 67 |
| 4.34 | Relative CD19+/CD5+ B-Zellzahl in- und out-season | 68 |
| 4.35 | Vergleich der CD19+/CD5+ B-Zellverteilung in den Subgruppen | 68 |
| 4.36 | Relative Plasmazellzahl in- und out-season | 69 |
| 4.37 | mögliche B-regulatorische Zellen in- und out-season | 69 |
| 4.38 | Korrelation der CD3+/CD5+/CD25+ T-Zellpopulation im Sputum und Blut (gemessen bei Allergikern in-season) mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum | 71 |
| 4.39 | Korrelation des IgE-Wertes mit CD5+/CD27-/CD38+ T-Zellpopulation im Sputum und Blut (gemessen bei Allergikern in-season) mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Blut | 71 |
| 4.40 | Korrelation des Pollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T-Zellpopulation im Sputum bei Allergikern in-season | 72 |
| 4.41 | Korrelation des Gräserpollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T-Zellpopulation im Blut bei Allergikern in-season | 73 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.42 | Korrelation des Birkenpollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T- Zellpopulation im Sputum bei Allergikern in-season | 73 |
| 4.43 | Korrelation des Birkenpollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T- Zellpopulation im Blut bei Allergikern in-season | 74 |
| 4.44 | Vergleich des prozentualen Anteils an Eosinophilen im Sputum bei Allergikern und Kontrollen in- und out-season | 76 |
| 4.45 | Vergleich des prozentualen Anteils an Eosinophilen zwischen in- und out-season innerhalb den Kontrollen und den Allergikern | 76 |
| 4.46 | Korrelation des prozentualen Anteils an Eosinophilen im Sputum aller Probanden in-season mit dem IgE-Gesamtspiegel gemessen im Serum | 77 |
| 5.1 | Kontrollmechanismus T-regulatorischer Zellen bei allergischer Antwort (Quelle: (Hawrylowicz, 2005)) | 82 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | v |
| 3.1 | Geräte | 15 |
| 3.2 | Programme | 16 |
| 3.3 | Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 3.4 | Reagenzien | 19 |
| 3.5 | Antikörperauswahl | 35 |
| 4.1 | Zellverteilung im Sputum bei Allergikern und Kontrollen | 75 |
| 5.1 | Prozentualer Anteil an CD19+/CD5+ B-Zellen | 90 |

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der durchflusszytometrischen Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im induzierten Sputum sowie im peripheren Blut bei Allergikern. Unter Allergien versteht man einen Kanon an Erkrankungen, bei denen das Immunsystem mit einer übermäßigen Reaktionsbereitschaft auf ubiquitär vorkommende Antigene, den sogenannten Allergenen, antwortet.

Dabei wurden Proben von über 40 Probanden, die an einer saisonalen Gräserpollenallergie leiden, sowie über 10 Kontrollpersonen, zur Analyse verwendet. Die Allergiker wurden klinisch nach strikten Kriterien ausgewählt und in Untergruppen eingeteilt. Diese wurden durch, an Asthma erkrankt oder nicht erkrankt und erfolgreich abgeschlossener Immuntherapie oder keiner, definiert. Die Probandenkohorte wurde ein Jahr lang betreut, währenddessen wurde bei jedem Teilnehmer Sputum- und Blutproben zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten genommen. Untersucht wurde das Zellprofil bei Pollenbelastung (in-season) sowie außerhalb der Allergiesaison (out-season). Um Zellen aus der Lunge zu gewinnen, wird häufig die Bronchio-Alveoläre Lavage (BAL) angewandt, ein invasives Verfahren bei dem Probenmaterial mit Hilfe der Bronchoskopie gewonnen wird. Eine nicht-invasive, risikoarme Methode stellt das induzierte Sputum dar, bei der Zellen sowie Proteinen direkt gewonnen werden. Somit bildet es eine Momentaufnahme des Entzündungsgeschehens vor Ort ab. Im Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit stehen die Lymphozyten. T- und B-Zellen dienen der Abwehr gegen Pathogene, können aber auch Immunreaktionen fein modulieren und orchestrieren. Da sie ihre Funktion nicht im Blut sondern weitestgehend im Interstitium ausüben, verlassen Leukozyten nach kurzer Zirkulationszeit das Blut, um an Orten hoher Leukozytenkonzentrationen, wie die Laminae propriae der Schleimhäute von Verdauungs- und Atemtrakt, aktiv zu werden. Dieser physiologische Aspekt trägt wesentlich dazu bei, dem Sputum bei immunmodulatorischen Prozessen in der Lunge mehr Beachtung zu schenken. Als Analysemethode wurde die Durchflusszytometrie gewählt. Dabei wurden insgesamt 13 verschiedene Antikörper verwendet, um eine möglichst präzise Differenzierung der einzelnen Subpopulationen zu gewährleisten.

Bei den T-Zellen lag der Fokus vor allem auf der Detektierung möglicher T-regulatorischer Zellen, eine heterogene Gruppe, die als eine der Hauptakteure bei der Regulation von Immunantwort und Selbsttoleranz gelten. Eine weitere wichtige Population stellen die terminal differenzierten, allergenspezifischen TH2-Effektorzellen dar, die entscheidend für die Entwicklung einer spezifischen Immuntoleranz sein könnten. Bei den B-Zellen lag der Schwer-

punkt auf den Memory-B-Zellen, die Teil des immunologischen Gedächtnisses sind und daher von fundamentalem Interesse, um die humorale Antwort besser zu verstehen. Eine weitere wichtige Zellpopulation stellen die regulatorischen B-Zellen da, eine differente Population, denen gemeinsam ist, inflammatorische Immunantworten zu unterdrücken und Immuntoleranz zu induzieren.

Kernaussage dieser Studie ist, dass Sputum ein probates Medium zur Erforschung von Entzündungsreaktionen im Zielorgan Lunge darstellt. Zudem werden bei fast jeder Zellsubpopulation die 4-5 -fachen relativen Prozentsätze an Immunzellen detektiert im Vergleich zum peripheren Blut. Des Weiteren fiel bei einer explorativen Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Daten auf, dass diese besser und aussagekräftiger mit den Ergebnissen der Sputumdaten korrelieren als mit den Blutdaten.

Möglicherweise spiegeln Zellen, die am Ort des Entzündungsgeschehens isoliert werden, einen deutlicheren Zusammenhang mit der Erkrankung wider als Probenmaterial aus dem Blut. Blutuntersuchungen stellen im klinischen Alltag nach wie vor den Goldstandard dar, da die Gewinnung leicht, risikoarm und zeitsparend ist. Gleichzeitig sollte überprüft werden, inwieweit dieses Medium repräsentativ für ein lokales Entzündungsgeschehen ist, da systemische Werte gemessen werden und keine Momentaufnahmen vor Ort.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Allergische Erkrankungen

Fließschnupfen, Niesattacken, brennende und tränende Augen, Atembeschwerden bis hin zu Atemnot, wem sind solche Symptome nicht bekannt? Stark gestiegene Krankheitshäufigkeiten in den letzten Jahrzehnten haben Allergien in den Mittelpunkt der Gesundheitsforschung gerückt (Schmitz, Kuhnert & Thamn, 2017). "Wir rechnen inzwischen nicht alleine mit einer Allergie-Welle, sondern einem Tsunami, der dann zu einem Asthma-Tsunami wird" so Elke Alsdorf vom Deutschen Allergie und Asthmabund (DAAB) auf dem EAACI-Kongress 2017 in Helsinki.

1.1.1 Definition, Häufigkeit und Altersbezug

Unter Allergien versteht man einen Kanon von Erkrankungen, bei denen das Immunsystem mit einer übermäßigen Reaktionsbereitschaft auf ubiquitär vorkommende Antigene (den so genannten Allergenen) antwortet (RKI & BZgA, 2008) (Renz, Agnes & Pfefferle, 2008). Aus dieser Entgleisung des Immunsystems entwickeln sich unterschiedliche Typen von Allergien, die sich in ihren Allergenen, den daraus resultierenden Effektormechanismen und den möglichen Krankheiten unterscheiden. Die Überempfindlichkeitsreaktionen werden nach Gell und Coombs in vier Typen unterteilt, wobei die allergische Rhinokonjunktivitis sowie das allergische Asthma bronchiale dem Typ 1 vom IgE vermittelten Soforttyp, der häufigsten Form von Hypersensitivität, zugeordnet werden (Murphy, Travers & Walport, 2009)(vgl. S.699).

Als Grund für das vermehrte Auftreten von Allergien wird ein multifaktorielles Ursa-

chengefüge angenommen (D'Amato et al., 2015) bei dem neben erblicher Anlage, auch Umwelteinflüsse und Lebensstil eine tragende Rolle spielen (Behrendt & Ring, 2012). Allergische Erkrankungen haben in den westlichen Industrienationen deutlich zugenommen, daher kommen den atopischen Krankheitsbildern wie Heuschnupfen, Neurodermitis und Asthma bronchiale besondere Bedeutung zu (RKI & BZgA, 2008). Prävalenz und Inzidenz sind stark altersabhängig, ungefähr 80% der Betroffenen erkranken vor dem 30. Lebensjahr.

Die Situation ist besonders bei Kindern besorgniserregend, gehören Allergien hier bereits zu den häufigsten chronischen Erkrankungen (Subbarao et al., 2015). Der sogenannte "atopische Marsch" bezeichnet den Wechsel von Neurodermitis bzw. Nahrungsmittelallergien zu Heuschnupfen und Asthma bronchiale, eine Entwicklung die sich mit zunehmenden Alter aufbauen kann (Amat et al., 2015). Insgesamt beträgt der Anteil an Kindern und Jugendlichen bei denen jemals im Leben eine atopische Krankheit festgestellt wurde 22,9%. Die Quote ist bei Jungen im Vergleich zu Mädchen am Anfang höher, gleicht sich allerdings mit zunehmenden Alter an (Schlaud, Atzpodien & Thierfelder, 2007). Des weiteren kam die Studie (KiGGS- Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendsurvey) zu der Feststellung, dass Kinder mit niedrigem Sozialstatus oder Migrationshintergrund seltener betroffen sind. Zudem scheinen sich die Prävalenzen zwischen Ost- und Westdeutschland vollständig angenähert zu haben. In Übereinstimmung mit der bisherigen Datenlage konnte diese Studie auch die Hygienehypothese stützen, erstmals formuliert von dem englischen Wissenschaftler D. Strachan 1989. Allerdings nehmen auch in wirtschaftlich schwächeren Ländern, wie in Teilen Afrikas und Südamerikas, die Prävalenzen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises bei Kindern stetig zu (Ait-Khaled et al., 2009).

Bei Erwachsenen hingegen beschrieb die Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS), die von 2008-2011 bundesweit repräsentative Daten zum allergischen Krankheitsgeschehen von 18-79 Jährigen erhob, dass aktuell fast 20% der Bevölkerung an mindestens einer Allergie leiden. Generell sind Frauen und jüngere Menschen häufiger betroffen. Der Studie zufolge liegt die Lebensprävalenz für Asthma bronchiale bei 8,6%, Heuschnupfen bei 14,8%, Neurodermitis und Urtikaria jeweils bei 3,5%. Hingegen ist zu beobachten, dass sich die Allergieprävalenz insgesamt von 32,7% auf 28,7% rückläufig zeigte, hingegen die Asthmaprävalenz im 10-Jahres-Trend weiterhin stieg, um fast 3% (Langen, Schmitz & Steppuhn, 2013). Diese Prävalenzsteigerung besonders bei jungen Erwachsenen konnte auch eine italienische Studie (De Marco et al., 2012), sowie eine weitere aus Großbritannien (Simpson & Sheikh, 2010) bestätigen. Zusammenfassend wird die Relevanz dieser

chronischen Krankheit deutlich. Dabei sollten in Zukunft auch verstärkt Faktoren Berücksichtigung finden, die der Entstehung von Allergien entgegen wirken.

1.1.2 Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis

Pathomechanismen

Der allergischen Rhinokonjunktivitis liegt pathophysiologisch eine IgE-abhängige Allergie vom Soforttyp, die wiederum mastzellabhängig ist, zugrunde. Allergene, häufig harmlose Antigene, dringen über Diffusion in die Schleimhautoberfläche ein und lösen dort eine TH2-vermittelte Reaktion aus. Hierbei geht der eigentlichen allergischen Reaktion eine Sensibilisierungsphase voraus. Dabei werden Antigene von dendritischen Zellen prozessiert und über MHC-II- Rezeptoren T-Zellen präsentiert. Die Differenzierung naiver allergenspezifischer T-Zellen zu TH-2-Zellen wird durch Zytokine wie IL-4 und IL-13 begünstigt. Diese aktivierten TH-2-Zellen stimulieren wiederum B-Zellen, IgE zu produzieren. Diese spezifischen IgE-Antikörper binden an den hoch affinen IgE-Rezeptor auf Mastzellen und Basophilen. Bei einem Zweitkontakt mit dem Allergen werden diese kreuzvernetzt. Dies führt zu einer Degranulation von Entzündungsmediatoren, gespeichert in Mastzellen und Basophilen, die ihrerseits die IgE-Produktion noch verstärken können, da sie nach Aktivierung IL-4 und CD40- Liganden erzeugen.

Eine wichtige Rolle kommt der Immunregulation bei der Kontrolle von allergischen Erkrankungen zu. Beachtliche Aufmerksamkeit erhielten in letzter Zeit die T-regulatorischen Zellen, die wahrscheinlich eine herausragende Funktion bei der Beeinflussung von Allergien innehaben.

Die Aktivierung von Mastzellen in der Submukosa der unteren Atemwege kann auch ein allergisches Asthma verursachen, eine chronische Atemwegserkrankung. Diese ist gekennzeichnet durch anfallsweise wiederkehrende, reversible expiratorische Dyspnoe, ausgelöst meist durch äußere Reize (z.B. Allergene), die auf einen überreagierenden Atemtrakt treffen. Asthma bronchiale ist charakterisiert durch eine ständig erhöhte Konzentration von TH-2-Lymphozyten, Eosinophilen, Neutrophilen und anderen Leukozyten (Murphy et al., 2009) (vgl. Kap.13 S.699-752). Auf dem Boden der bronchialen Hyperreagibilität kommt es langfristig zu einer morphologisch und histologischen Veränderung der Bronchialwände: Hyperplasie von Becherzellen, mukösen Drüsen und Bronchialmuskulatur, Verbreiterung der Basalmembran, Ansammlung von Eosinophilen und anderen Abwehrzellen in der Lamina propria der Lunge (Lüllmann-Rauch, 2009) (vgl. S.340), dem sogenannten "remodeling"

(Kemp, 2009). Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit einer allergischen Rhinitis (Pariente, LePen, Los & Bousquet, 1997) 3,2 -fach höher an Asthma zu erkranken. Ergänzend zur Pathologie allergischer Reaktion ist zu nennen, dass bei der Entstehung von Entzündung eine Sofortreaktion von einer Spätreaktion, gekennzeichnet durch das Auftreten von T-Effektorzellen, zu unterscheiden ist.

Die Intention dieser Arbeit besteht darin, einen detaillierteren Einblick in die fein orchestrierte Zellmodulation bei allergischen Erkrankungen zu liefern. Das Augenmerk lag im Besonderen auf den vermuteten pathophysiologischen Hauptakteuren, den T- und B-Zellen und ihren vielfältigen Subpopulationen. Die spezifische zelluläre Abwehr, repräsentiert durch die T-Effektor, T-regulatorischen, T-Helfer und T-Suppressor-Zellen, wird komplementiert durch das System der humoralen, Antikörper-vermittelten Abwehr, deren zelluläres Korrelat die B-Zellen darstellen. Auch bei den B-Zellen, die in jüngster Zeit mit zunehmenden Interesse wissenschaftlich betrachtet werden, finden sich B-regulatorische und B-Memory-Zellen. Diese Subpopulation scheinen einen entscheidenden Einfluss auf die Modulation der Entzündungsreaktion zu nehmen. Somit liefert die Analyse und Charakterisierung, der am Ort des Geschehens vorherrschenden Zellpopulationen, wichtige Erkenntnisse für zielgerichtete Therapiemöglichkeiten in der Zukunft (Murphy et al., 2009) (vgl. Kap.13 S.699-752).

Regulatorische T-Zellen

Die in der Peripherie vorkommenden regulatorischen T-Zellen (Tregs) sind eine heterogene Gruppe an Zellen mit unterschiedlichen Entwicklungsursprüngen. Natürliche regulatorische T-Zellen werden während ihrer Entwicklung im Thymus geprägt. Dabei handelt es sich um CD4 positive Zellen, die auch die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und zusätzlich den Rezeptor CD62L (L-Selektin) exprimieren und potenziell autoreaktiv sind. Natürliche T-regulatorische Zellen werden unter anderem über die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 identifiziert und machen etwa 10-15% der CD4 positiven T-Zellen im humanen Kreislauf aus (Murphy et al., 2009)(vgl. S.447). Es gibt Hinweise, dass sie Zytokine wie IL-10 und TGF- β freisetzen, wodurch die T-Zell-Proliferation gehemmt wird. Ein Versagen der natürlichen Treg-Funktion in-vivo führt zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen. In-vitro können Tregs auch antigenspezifische T-Zell-Proliferationen als Reaktion auf allo-gene Zellen unterdrücken.

Eine zweite Population adaptiver regulatorischer T-Zellen entwickelt sich in der Peripherie. Diese bilden eine heterogene Gruppe mit der Subgruppe der TH3-Zellen. Diese kommen

im mukosalen Immunsystem vor und produzieren IL-4, IL-10 und TGF- β . Sie stammen wahrscheinlich aus den Schleimhäuten und verhindern oder kontrollieren zumindest die Immunantwort.

Eine andere Untergruppe bezeichnet man als TR-1-Zellen, die bisher in vitro erzeugt wurden und wahrscheinlich auch in-vivo vorkommen. Sie lassen sich unter hohen Konzentrationen von IL-10 in Kultur ziehen, dabei kann ihre Entwicklung noch mit IFN- α unterstützt werden. Sie sezernieren das inhibitorische Zytokin TGF- β , jedoch kein IL-4 (Murphy et al., 2009) (vgl. S.447-450).

Regulatorische B-Zellen

Der aktuellen Studienlage zufolge lassen sich regulatorische B-Zellen (Bregs) wahrscheinlich ebenso wie die regulatorischen T-Zellen funktionell in verschiedene Untergruppen einordnen. Gemeinsam ist allen eine inflammatorische Antwort zu unterdrücken und Immuntoleranz zu induzieren (Blair et al., 2010) (Mauri, Gray, Mushtaq & Londei, 2003). Allerdings ist die Datenlage noch unsicher, inwieweit es eine eigenständige regulatorische B-Zell-Population gibt oder ob B-Zellen unter besonderen Voraussetzungen zu solchen konvertieren.

Anhand von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Bregs erst unter inflammatorischen Bedingungen aktiviert werden. Bislang existieren nur wenige Hinweise auf regulatorische B-Zellen im Menschen (Tretter & Lorenz, 2010). Jedoch konnte eine Studie zeigen, dass aktivierte B-Zellen unter günstigen Bedingungen zu Bregs konvertieren und dabei aktivierte T-Helfer-Zellen wirkungsvoll supprimieren können (Tretter et al., 2008). Eine andere Gruppe konnte transitionelle B-Zellen identifizieren, die in vitro die Zytokinproduktion von autologen TH1-Zellen hemmen (Mauri et al., 2003). Auch die Produktion und Sezernierung von immunsuppressiven Zytokinen, wie Interleukin IL-10 oder TGF- β , wurde für einige Breg-Untergruppen gezeigt (Bouaziz, Yanaba & Tedder, 2008) (Tian et al., 2001). Inzwischen geht man davon aus, dass es verschiedene Subtypen (phänotypisch mit unterschiedlichen Oberflächenantikörpern zu detektieren) existieren (Lampropoulou et al., 2010). Ein einheitlicher Phänotyp für Bregs konnte bisher nicht benannt werden, wodurch die Identifikation im Humanen erschwert wird (Tretter & Lorenz, 2010).

Pollen als Allergieauslöser

Allergien können durch verschiedenste Allergene ausgelöst werden. Zu den perirenen Allergieauslösern zählen Hausstaubmilben und Tierhaarepithelien, zu den saisonalen Pollen. Ziel dieser Studie gilt der Beobachtung von Gräserpollenallergikern, da Gräserpollen das häufigste und wichtigste Aeroallergen in Deutschland darstellen (Haftenberger et al., 2013).

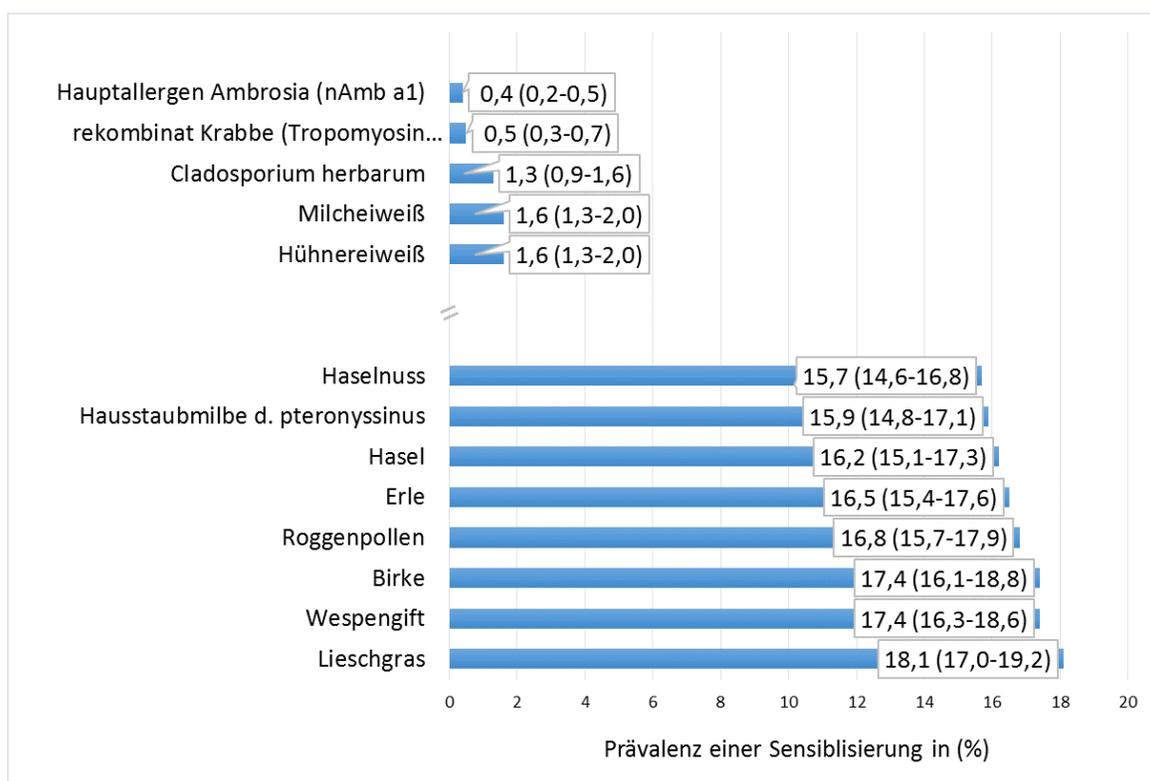


Abbildung 1.1: Ausschnitt aus den Prävalenzen (in% gewichtet) und 95% Konfidenzintervallen von Sensibilisierungen gegen 50 Allergene in der deutschen Bevölkerung (DEGS1, n=7025) (Quelle:(Haftenberger et al., 2013))

Pollenallergien sind einem besonderen Wandel unterworfen, da sich im Zuge der globalen Klimaerwärmung nicht nur der jahreszeitliche Pollenflug verändert, sondern auch nicht indigene Pflanzen heimisch werden, wie der Neophyt Ambrosia (Davies, 2014). Betrachtet man Gräserpollen genauer, setzen sie sich aus einer heterogenen Gruppe von Grasarten zusammen. Zu den jeweiligen Familien zugehören die Süßgräser (Poaceae), wichtigste Vertreter hier sind das Lieschgras und der Roggen, die Riedgräser (Cyperaceae), sowie die Binsengewächse (Juncaceae). Mit einer Gräserpollenbelastung rechnet man von Mitte April,

die wegen der Artenvielfalt, bis Mitte November dauern kann, wobei der Hauptpollenflug von Mitte Mai- bis Anfang August stattfindet. Die Allergenpotenz der Gräser ist extrem hoch, deshalb stellen sie die wichtigsten Allergene in West- und Mitteleuropa dar (Panzner, Vachová, Vítovcová, Brodská & Vlas, 2014).

Die Antigene selbst sind verschiedene Proteine und Glykoproteine und liegen auf der Pollenoberfläche oder in Vesikeln gespeichert im Pollen (Suphioglu et al., 1992). Diese Antigene werden in Major- und Minor-Allergene unterschieden (Chakra et al., 2012), wobei für die Definition von einem Majorantigen mindestens 50% der Allergiker sensible reagieren müssen. Besonders wichtig ist diese Klassifizierung für die Therapie der Immunhyposensibilisierung.

Außerdem ist zu beachten, dass es zu Kreuzreaktionen zwischen Pollen und pollenassoziierten Nahrungsmitteln kommen kann, dem sog. oralen Allergiesyndrom. Diese Kreuzreaktion beruht auf der botanischen Verwandtschaft und der strukturellen Ähnlichkeit molekularer Allergene in Pollen und Nahrungsmitteln z.B. Kern- und Steinobst. Bei Gräserpollenallergikern gilt besondere Vorsicht bei Getreideprodukten und Hülsenfrüchten (Moll, Bahmer, Bayerl, Augustin & Bahmer, 2010)(vgl. S.141).

1.1.3 Handlungsbedarf - Relevanz für die Gesundheitspolitik

Folgekosten von Erkrankungen werden in direkte, indirekte und intangible Kosten eingeteilt. Direkte Kosten spiegeln die monetären Mittel der medizinischen Behandlungskosten wider, indirekte Kosten die Folgen von Verdienstaufschlägen (Arbeitsunfähigkeit, Berufsunfähigkeit, vorzeitige Rente und Todesfälle). Die Verminderung der Lebensqualität wird unter dem Begriff der intangible Kosten erfasst (Blais, 2007).

Nach der Gesundheitsberichterstattung des Bundes (GBE) lagen 1996 die direkten Kosten allergischer Erkrankungen bei 3,5 Mrd. Euro (allergische Rhinitis 239 Mio. Euro, Asthma bronchiale 2,35 Mrd. und Neurodermitis 857 Mio.). Die Daten wurden im Jahre 2000 vom statistischen Bundesamt herausgegeben (John, 2002).

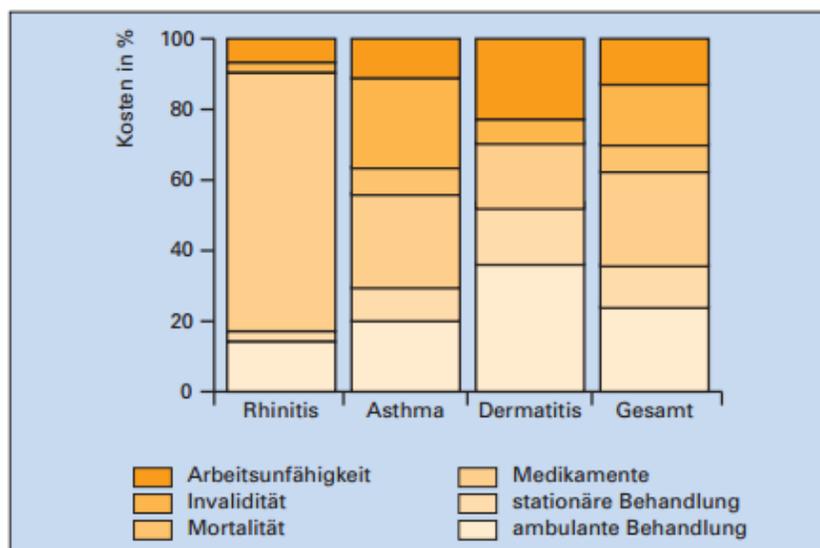


Abbildung 1.2: Kostenstruktur allergischer Krankheiten 1996 (Quelle: (Wahn & Wichmann, 2000))

Somit ist Asthma für fast 70 % der direkten Ausgaben bei allergischen Erkrankungen verantwortlich, darüber hinaus auch für hohe indirekte Kosten, wie Invalidität und Arbeitsunfähigkeit, im Gesamten 5,81 Mrd. Euro (Weissflog, Matthys & Virchow, 2001). Nach Biermann et al. (2013) zufolge tragen auch die stagnierenden SIT-Behandlungen (spezifische Immuntherapie) dazu bei, dass mittel- und langfristig zusätzliche Kosten durch die Progredienz der Erkrankung entstehen, z.B. durch Zunahme des allergischen Asthmas. Zu einer deutlichen Reduktion der allergisch-bedingten Morbidität sowie der damit verbundenen Gesundheitsausgaben, kann eine frühzeitige SIT-Therapie führen (Biermann, Merk,

Wehrmann, Klimek & Wasem, 2013). Aus dem Fehlzeitreport 2007 und den Analysen des Wissenschaftlichen Institutes der Allgemeinen Ortskassen (WIdO) lassen sich weitere Daten ableiten (Badura et al., 2007).

| Ärztliche Diagnose | Fälle Arbeitsunfähigkeit (gerundet) | Anteil der AOK Mitglieder in % | Tage je Fall |
|--|---|-----------------------------------|--------------|
| Allergische Rhinopathie | 25.000 | 0,16 | 6,1 |
| Asthma bronchiale | 61.410 | 0,40 | 10,9 |
| Atopisches Ekzem | 10.000 | 0,07 | 11,8 |
| Allergische Kontaktdermatitis | 14.000 | 0,09 | 9,9 |
| Dermatitis durch oral aufgenommene Substanzen | 2.000 | 0,01 | 11,3 |

Abbildung 1.3: Leistungen und Lasten des Gesundheitssystems durch allergische Erkrankungen am Beispiel der AOK-Versicherten (Quelle: WIdO (Wissenschaftliches Institut der AOK) (Badura et al., 2007))

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass durchschnittlich jede zehnte Krankenschreibung auf eine allergische Erkrankung zurückzuführen ist, wobei die häufigste das Asthma darstellt. Hochgerechnet auf die Bevölkerung Deutschlands lagen somit die Arbeitsunfähigkeitskosten, verursacht durch Asthma, für das Jahr 2006 bei ca. 240 Mio. Euro. Fehlzeiten von anderen Gruppen die ebenfalls massiv zur sozioökonomischen Kranklast beitragen, wie bei Kindern und Jugendlichen die Leistungsminderung und Schulfehlzeiten, werden dabei nicht berücksichtigt, eben sowenig die immense Einschränkung der Lebensqualität. Zudem müssen rund 30.000 Jugendliche pro Jahr ihre Ausbildung allergiebedingt abbrechen. Weltweit schätzt die WHO den Verlust an Lebensqualität durch verlorengegangenen Lebensjahre für Asthma auf 15 Mio. Jahre pro Kalenderjahr ein, ähnlich hoch wie Diabetes oder Schizophrenie (Bousquet, van Cauwenberge, Paul Khaltsev & in collaboration with WHO, 2001). Alleine in der EU entstehen jährlich direkte und indirekte Kosten von rund 25 Mrd. Euro verursacht durch Allergien (Accordini et al., 2008).

Vor dem Hintergrund steigender Kosten und wachsender Leistungen im Gesundheitssektor ist die umfassende Erforschung von allergischen Erkrankungen essenziell. Mit dieser Forschungsarbeit wird ein wichtiger Beitrag zur Ursachenforschung geleistet, die Ansatzpunkte für neue Präventionsstrategien und Kausaltherapien liefern kann. Trotz intensiver Bemühungen auf dem Gebiet der biomedizinischen Forschung sind Allergien und Asthma

bis heute nicht heilbar (Renz et al., 2008).

1.1.4 aktuelle Leitlinie - Allergieprävention

Evidenzbasierte Präventionsempfehlungen und Behandlungsleitlinien sind für eine qualitativ hochwertige Therapie der Patienten essentiell, besonders durch eingeschränkte Möglichkeiten einer kausalen Behandlung. Allerdings sind auch Leitlinien einer ständiger Weiterentwicklung unterworfen, da auch Evidenzen widersprüchlich sein können. Folgende Leitlinien beziehen sich auf die zweite Überarbeitung (2014) der ersten S3-Leitlinien, die 2004 zur Allergieprävention veröffentlicht wurde (Schäfer et al., 2004). Hieraus ergibt sich der Empfehlungsgrad Typ A (sehr empfohlen) für das Vollstillen der Säuglinge bis zum 4 Lebensmonat und der Einsatz von Hydrolysatmilch für Risikokinder, des Weiteren geht man von einem protektiven Effekt durch frühzeitigen Fischkonsum aus (Typ B). Protektiv auf Asthma wirkt sich ein Body-Mass-Index (BMI) im Normalbereich aus (Typ A), hingegen zeigte die Reduktion von Hausstaubmilben, als protektive Einzelmaßnahme keinen präventiven Effekt (Typ B). Eine Erhöhung des Asthmarisikos konnte für die Exposition gegenüber Tabakrauch (Typ A) und Kfz-Emissionen gezeigt werden (Typ B). Jedoch konnten keine Belege gefunden werden, dass Impfen das Allergierisiko erhöht. Aus diesem Grund wird weiterhin empfohlen auch Risikokinder nach den STIKO-Empfehlungen zu impfen (Schäfer et al., 2014).

1.1.5 Immuntherapie

Die einzige wirksame kausale Therapie der Allergie (Senekamp et al., 2002), neben Vermeidung der Allergenexposition, stellt die Hyposensibilisierung dar. Es gibt verschiedene Verfahren. Im folgenden wird die spezifische Immuntherapie (SIT), die sowohl subkutan (SCIT) als auch sublingual (SLIT) erfolgen kann, erläutert. Ein Teil der Probanden hat diese Therapie erhalten. Zur Desensibilisierung injiziert oder verabreicht man dem Patienten Dosen mit steigender Allergenmenge, mit dem Ziel den Grad der Allergie abzuschwächen (Bousquet et al., 1998).

Die SIT greift in die grundlegenden immunologischen Mechanismen mit einer langfristig resultierenden Verschiebung der Immunantwort ein. Die vorherrschende dominante TH2-Antwort (z.B IL-4, IL-5, IL-13) wird zugunsten einer stärkeren TH1-Antwort (Interferon- γ) abgelöst.

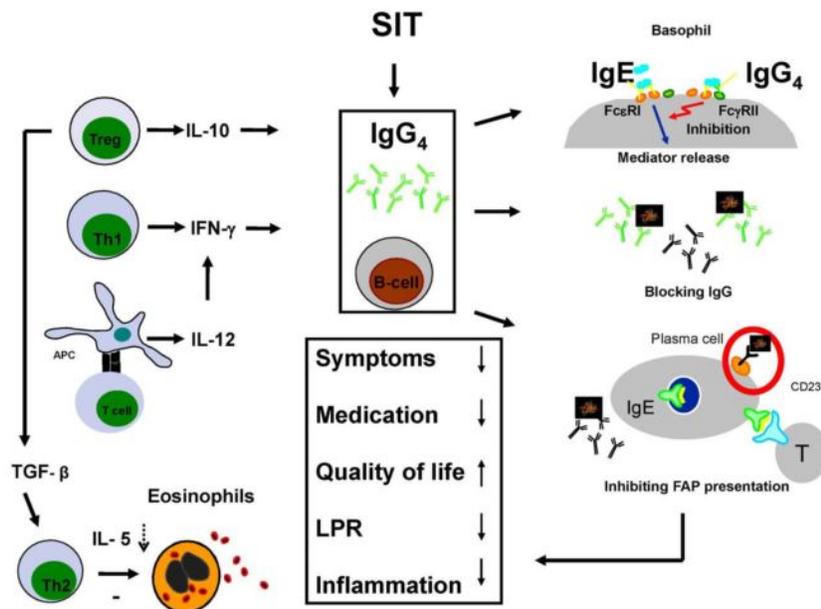


Abbildung 1.4: Auswirkungen einer subkutanen Immuntherapie (SIT) auf die Immunmodulation (Quelle:(Jacobsen et al., 2012))

Durch die Aktivierung regulatorischer CD4 positiver T-Zellen, die Interleukin (IL-10) und TGF- β produzieren, werden die TH2-Zellen in ihrer proinflammatorischen Funktion gehemmt. Daneben wird eine gegenregulatorische TH1 Immunantwort (Immundeiviation) induziert durch IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Die daraus resultierende erhöhte IFN- γ -Produktion hemmt die IgE-Bildung und die Differenzierung von TH2-Zellen. Sekundär kommt es nicht nur zu einer Reduktion der allergen-spezifischen IgE-Produktion, sondern auch zur Induktion der allergen-spezifischen IgG-Produktion (Robinson, Larché & Durham, 2004) (Kleine-Tebbe et al., 2006).

Vorhergehende Studien konnten zeigen, dass eine SCIT zu einer selektiven Elimination von TH2-Zellen führt (Wambre et al., 2012) und zu einem Anstieg an T-regulatorischen Zellen (Satoguina et al., 2008) (Francis et al., 2008). Allerdings handelt es sich bei den Veröffentlichungen um Erklärungsmodelle mit dem Versuch die Komplexität der Realität zu veranschaulichen.

Bei einer allergischen Rhinokonjunktivitis, ausgelöst durch Pollen oder Hausstaubmilben, ist die Wirksamkeit der SCIT durch zahlreiche kontrollierte Studien dokumentiert. Außerdem ist sie besonders empfehlenswert bei intermittierendem und geringgradig persistierendem IgE-vermitteltem allergischem Asthma (Kleine-Tebbe et al., 2006).

In der folgenden Arbeit sollte der Einfluss einer Immuntherapie bei therapierten Patienten

auf die T- und B-Zellsubpopulation untersucht werden. Außerdem wurde auf Populationsveränderungen bzw. Verschiebungen geachtet, die sich eventuell im peripheren Blut oder Sputum zeigen könnten.

1.2 Sputum

Im klinischen Alltag sind mehrere Methoden etabliert, um Zellen aus der Lunge zu gewinnen. Häufig wird hierbei die bronchio-alveoläre Lavage angewandt, ein nicht risikoloses, invasives Verfahren, bei der Probenmaterial mit Hilfe der Bronchoskopie gewonnen wird. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Untersuchung des Atemkondensats. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass nur der Proteingehalt bestimmt werden kann, allerdings keine Zellen gewonnen werden.

Die einzige nicht-invasive Methode stellt das induzierte Sputum dar, bei der Proteine sowie Zellen gewonnen werden. Sputum stellt somit eine Momentaufnahme des Entzündungsgeschehens vor Ort dar. Als Sputum werden die Sekretionen der Atemwegsepithelien und der submukösen Drüsenzellen aus den unteren Atemwegen bezeichnet. Sputum ist ein heterogenes Gemisch aus diversen Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen, aber auch squamösen Zellen (Hansel & Walker, 1992). In den 60er Jahren des 20. Jhr. wurden schon Untersuchungen am Sputum vorgenommen, mit dem Ziel differenzierbare zytologische Präparate anzufertigen um bronchiale Erkrankungen zu charakterisieren (Chodosh, Zaccheo & Segal, 1962). In den folgenden Jahren versuchte man standardisierte Protokolle zur Induktion und Aufreinigung von Sputumproben zu etablieren (Gibson, 1998). Zudem gab es vielfältige Probleme zu klären, wie z.B. die Länge der Induktion, die Wahl der Kochsalzkonzentration und die Prozessierung (Cataldo et al., 2001). Ein richtungsweisendes Protokoll zur standardisierten Sputumprozessierung wurde von Dr. Zissler im Rahmen seiner Promotionsarbeit etabliert. Nach diesem orientiert sich auch der Aufarbeitungsprozess des Sputums dieser Doktorarbeit.

Aus verschiedenen Studien wird ersichtlich, dass unterschiedliche Zellidentitäten (Eosinophile, Neutrophile, Makrophagen, Muzine...) des Sputums zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Sputuminduktion gesammelt werden (Gershman, Liu, Wong, Liu & Fahy, 1999) (Holz et al., 1998) (Moodley, Krishnan & Lalloo, 2000). Hieraus wird ersichtlich, weshalb das exakte Einhalten eines zuvor genau definierten Sputumprotokolles essenziell für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist. Außerdem musste festgelegt werden, ob das gesamte expektorierte Material für die Analyse verwendet wird oder nur die selektierten Spu-

tumplugs ohne Saliva. Hier konnte die Studie (Pizzichini, Pizzichini, Efthimiadis, Hargreave & Dolovich, 1996) zeigen, dass Proben mit Saliva einen höheren Anteil an Plattenepithelzellen enthielten. Deswegen wurde in der folgenden Arbeit die Methode der ausgewählten Sputumflocken bevorzugt, da das Interesse besonderes den unterschiedlichen Lymphozyten gilt. Außerdem wurde DTT zur Spaltung der Disulfidbrücken gewählt, die zahlreich in den Mucus-Glykoproteinen der hochviskösen Sputummatrix vorkommen (Popov et al., 1994). Die Wirksamkeit dieses Agens wurde in der Arbeit von Dr. Zissler bestätigt (Zißler, 2012). Die so gewonnene Zellsuspension wurde zur Herstellung von Zytospins, als auch für die Durchflusszytometrie, verwendet. Bisher existieren nur wenige Veröffentlichungen über Daten bei denen die Zellcharakterisierung- und verteilung im Sputum mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde.

Kapitel 2

Zielsetzung

Im Rahmen der Disseration wird untersucht, inwieweit Sputum sich als nicht-invasives Medium für allergisch-entzündliche Prozesse der menschlichen Atemwege eignet.

1. Möglichkeiten und Grenzen der Durchflusszytometrie am Probenmaterial Sputum
⇒ Analyse und Charakterisierung der Voraussetzungen für valide Ergebnisse
2. Vollständige durchflusszytometrische Untersuchung des induzierten Sputums und des peripheren venösen Blutes
⇒ Optimierung eines Auswertungspanels, welches für beide Ausgangsmaterialien geeignet ist
3. Charakterisierung von T- und B-Zellsubpopulationen im Sputum und im peripheren venösen Blut während der Graspollensaison im Vergleich zu keiner Allergiebelastung
⇒ Untersuchung lokaler immunmodulatorischer Mechanismen in der Lunge, einschließlich Fokusuntersuchung in den Subgruppen
4. Vergleich der Durchflusszytometriedaten vom Sputum und peripheren Blut
⇒ Diskussion der klinischer Relevanz und mögliche Methodenverbesserung in der klinisch-allergischen Diagnostik
5. Korrelation der experimentellen Daten mit klinischen Ergebnissen
⇒ Erstellung von Zusammenhängen zwischen lokaler Zellantwort und klinischen Parametern

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Hilfsmittel

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte

| Verwendung | Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|
| Blutdruckmessgerät | | boso medicus |
| Computer | ThinkPad T530i | Lenovo |
| Durchflusszytometriegerät | FACS Fortessa | BD |
| Färbewanne | | |
| Mikroskop | Axiovert 40C | Zeiss |
| Mikroskop | Mikroskop | Leica |
| Mixer | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries |
| Pipetierhilfe | Swift PET | BIMED hat |
| Pipetten | 100-1000µl | eppendorf |
| | 10-100µl | eppendorf |
| | 0,5-10µl | eppendorf |
| | 0,1-2,5µl | eppendorf |
| Schüttler | rollermixer SRT9D | stuart |
| Spirometer | Spiro Plus | Jaeger, USA |

| Verwendung | Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------|--|---|
| Sputuminduktion | Pari Turbo Boy SX | PARI, Deutschland |
| Transferpipette | 20-200 μ l | Brand |
| Waage | PB303 Delta Range | Mettler Toledo |
| Zählkammer | Neubauer Improved 0,0025mm ² | Marienfeld GmbH |
| Zentrifugen | 380R 5 U30R Megafuge 1.0R | Hettich eppendorf Thermo Scientific |
| Zytospinhalter | Shandon Cytoclip | Thermo Scientific |
| Zytospinzentrifuge | Cytospin 4 | Thermo Scientific |

3.1.2 Programme

Tabelle 3.2: Programme

| Programme | Version | Hersteller |
|--------------------|---------|----------------------------|
| Excel | 2013 | Microsoft Corporation, USA |
| FACS Diva Software | 7.0 | Becton Dickensen, USA |
| GraphPadPrism | 6.01 | Graphpad Software, USA |
| LaTeX | 2e | LaTeX Team |
| Mendeley | 1.14 | Mendeley Ltd. |
| Windows | 10 | Microsoft Corporation, USA |

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien

| Verwendung | Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------|--|--------------------|
| Adapter | REF | SARSTEDT |
| Butterfly | Safety-Multifly-Kanüle | SARSTEDT |
| Bronchodilatator | Sultanol 100mg/Dosis | GlaxoSmithKline |
| Deckgläschen | | |
| Einwegpipette | Pasteurpipette Plastik bis 3ml | neoLab |
| Facstubes groß | 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube | BD Falcon |
| Facstubes klein | | |
| Filter | Cell Strainer 70µm Nylon | BD Falcon |
| Hautantiseptikum | octeniderm | schülke |
| Immersionsöl | Type N | Leica Microsystems |
| Kulturplatte | 96 well, U-botton Non-Tissue Culture plate | Falcon |
| Objektträger | Menzel-Gläser Superfrost | Thermo Scientific |
| Papierfilter | | |
| Pipetten | Cellstar 25ml | greiner bio-one |
| | Cellstar 10ml | greiner bio-one |
| | Cellstar 5ml | greiner bio-one |
| Pipettenspitzen | Diamond 200µl-Tip | Gilson |
| | Standart 50-100µl | eppendorf |
| | Standart 2-200µl | eppendorf |
| | Standart 05,-20µl | eppendorf |
| | Standart 0,1-10µl | eppendorf |
| Pricktest-Lanzette | | Allergopharma |

| Verwendung | Bezeichnung | Hersteller |
|----------------------|------------------------------------|-------------------|
| Pricktestlösung | Physiologische Kochsalzlösung | Allergopharma |
| | 309 Katzenepithelien | Allergopharma |
| | Histamin 1+999 | Allergopharma |
| | 006 Gräser | Allergopharma |
| | 108 Birke | Allergopharma |
| | 708 Dermatophagoides farinae | Allergopharma |
| | 725 Dermatophagoides pteronyssinus | Allergopharma |
| Reagiergefäße | 1,5ml Safe Seal | SARSTEDT |
| | 2,0ml Safe Seal | SARSTEDT |
| | Falcon Tube 50ml | SARSTEDT |
| Schwangerschaftstest | hcg combo | HITADO |
| Serumröhrchen | Monovette | SARSTEDT |
| Blutabnahmeröhrchen | Vacutainer CPT™ | BD |
| Zellkulturschale | Petrischale D=100mm | TPP |
| Zytospinfilterkarten | Shandon Filter Cards | Thermo Scientific |

3.1.4 Reagenzien

Tabelle 3.4: Reagenzien

| Produkt | Hersteller |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Alexa Fluor 700 anti-human CD14 | BioLegend |
| Ampuwa 100ml H2O | Fresenius Krabi |
| APC anti-human CD138 | BioLegend |
| APC/Cy 7 anti-human CD 45 | BioLegend |
| BD Pharmingen™ 7-AAD | BD Bioscience |
| Brilliant Violet 605 anti-human CD 19 | BioLegend |
| Brilliant Violet 650 anti-human CD25 | BioLegend |
| Brilliant Violet 711 anti-human CD 27 | BioLegend |
| DPBS(1X) | gibco by life technologies |
| Eukitt | Fluka |
| FACSClean | BD Bioscience |
| FACSRinse | BD Bioscience |
| Fetal Bovine Serum | HyClone |
| FITC anti-human CD5 | BioLegend |
| Giemsa | Merck |
| Human TruStain FcX™ | BioLegend |

| Produkt | Hersteller |
|--|-----------------------------------|
| May-Grünwald | Merck |
| Methanol | Fluka |
| NaCl (3%, 4%, 5%) | Apotheke Klinikum Rechts der Isar |
| NaN ₃ 2% in DPBS | |
| PE anti-human CD1d | BioLegend |
| PE-CF 594 Mouse-Anti-Human CD24 | BD Bioscience |
| PE/Cy 7 anti-human CD 23 | BioLegend |
| RNAprotect Cell Reagent | Qiagen |
| Sputolysin | Merck |
| Trypan Blue Stain 0,4% 1:10 verd. mit DPBS | gibco by life technologies |
| V450 Mouse Anti-human CD38 | BD Horizont |
| V500 Mouse Anti-Human CD3 | BD Horizont |
| Xylol | Merck |
| Anti-Mouse Ig k BD Comp Beads | BD Bioscience |
| Cytometer Setup&Tracking Beads | BD Bioscience |

3.2 Studienteilnehmer

3.2.1 Ethische Richtlinien

Die in der Studie vorgenommenen Experimente wurden zuvor von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Außerdem wurde beim Arbeiten mit Probandenmaterial wie induziertem Sputum oder peripherem Blut die Richtlinien der Erklärung von Helsinki eingehalten. Somit liegt von jedem Studienteilnehmer eine Einverständniserklärung zur Teilnahme vor. Zusätzlich wurde ein Kurs in Good Clinical Practice belegt.

3.2.2 Charakterisierung der Probanden

Die Studie wurde in zwei Messzeiträume, Pollenbelastung (in-season) und keine Allergenbelastung (out-season) untergliedert. Als Grundlage diente der "Regionale Pollenkalender süddeutscher Raum" (nach Pollenflugdaten von 2007-2011) der Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst. Entscheidungsgrundlage für die Terminierung des ersten Messdurchgangs stellte der Gräserpollenflug dar, der witterungsabhängig von Mitte Mai bis Mitte Juli stattfindet. In diesem Zeitraum wurden alle Probanden zum ersten Mal getestet. Der Zeitraum außerhalb des Pollenfluges war von November bis Mitte Februar. Die Probandenkohorte setzte sich, wie durch vorliegende Diagramme verdeutlicht, aus 53 Probanden während der Pollensaison zusammen, davon waren 12 Kontrollpersonen und 41 Allergiker. Einige der Probanden waren bereits gut vorcharakterisiert. Bei einer Allergikerin konnte kein Sputum gewonnen werden, da sie physisch nicht in der Lage war Sputum zu expectorieren. Einschlusskriterien waren eine im Idealfall isolierte anamnestiche Pollenallergie, ein Lebensalter größer 18 Jahre. Ausschlusskriterien stellten unter anderem ein frischer Infekt, Schwangerschaft oder durchgehende Medikamenteneinnahme dar.

| | | | |
|-------------------------|---------------|---------------|-------------------------|
| in-season: n=52 | | | |
| Allergiker: n=40 | | | Kontrollen: n=12 |
| Asthma+/SCIT+ | Asthma+/SCIT- | Asthma-/SCIT+ | Asthma-/SCIT- |
| n=12 | n=9 | n=10 | n=9 |

Abbildung 3.1: Patientenkohorte in-season

| | | | |
|-------------------------|---------------|---------------|------------------------------------|
| out-season: n=59 | | | |
| Allergiker: n=38 | | | Kontrollen: n=21 (-1) (+10) |
| Asthma+/SCIT+ | Asthma+/SCIT- | Asthma-/SCIT+ | Asthma-/SCIT- |
| n=11 (-1) | n=8 (-1) | n=10 | n=9 |

Abbildung 3.2: Patientenkohorte out-season

Die anamnestische Pollenallergie wurde mit eines Prick-Test-Screenings überprüft. Dabei stellte eine zusätzliche Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben oder Katzenepithelien kein Ausschlusskriterium dar, solange keine Symptome oder eine Exposition bestand. Zur zusätzlichen Objektivierung wurde im Serum noch der Gesamt-IgE Spiegel bestimmt und mit Hilfe des RAST-Tests das spezifische IgE gemessen. Anhand dieses Wertes konnte man die Allergiker in sechs verschiedene sogenannte RAST-Klassen einteilen. Bei unterschiedlichem Testergebnis zwischen Prick und RAST-Test wurde noch ein Immunocapttest angefordert. Bei weiterer Diskordanz wurde der SX 1-Test durchgeführt. Dieser Test gehört zu den ImmunoCap-Verfahren und ist geeignet zur primären Suche gegenüber atopischen Erkrankungen, da er sich aus einer Mischung der meist verbreitetsten Inhalationsallergenen zusammensetzt.

Zusätzlich wurden die Allergiker gebeten den mRQLQ (Rhinitis Quality of Life Questionnaire) auszufüllen. Mit diesem spezielle Fragebogen bewerteten die Studienteilnehmer ihre Beschwerden anhand von 28 Fragen aus 7 Bereichen wie z.B. Aktivitätseinschränkung, Schlafprobleme oder Nasensymptome. Hieraus ergaben sich Werte zwischen 0 für keine und

6 für schwere Beeinträchtigung, so dass eine Einschätzung der subjektiven Lebensqualität möglich war.

Innerhalb der Allergikergruppe litten 21 Probanden an einem Asthma, 20 hingegen nicht. Die Asthmasymptomatik wurde mit Hilfe der Spirometrie überprüft. Anhand der GINA-Klassifikation zeigte sich, dass alle Asthmatiker an einem kontrollierten Asthma litten. Außerdem hatten 12 Asthmatiker eine Immuntherapie erfolgreich abgeschlossen, die restlichen 9 Patienten hingegen hatten sich noch keiner systemischen Immuntherapie unterzogen. In der Nicht-Asthmatikergruppe hatten 11 Probanden eine Immuntherapie absolviert und 9 keine. Die in-season Kohorte setzte sich aus einem prozentualen Anteil von 43,4% Frauen und 56,6% Männern zusammen, der Altersdurchschnitt betrug 29,3 Jahre.

Out-season wurde dieselbe Probandenkohorte wiederholt eingeladen, allerdings schieden drei Probanden aus der Studie aus (non-compliance, Schwangerschaft). Zusätzlich wurden 10 weitere Kontrollprobanden eingeladen. Insgesamt betrug der weibliche Anteil 46,7% und der männliche 53,3%, der Altersdurchschnitt lag bei 28,8 Jahren.

3.3 Klinische Sputum- und Blutgewinnung

Das verwendete Sputuminduktions- und Aufbereitungsprotokoll wurde von Dr. Zissler, basierend auf seiner Doktorarbeit (Zißler, 2012), im Zentrum für Allergie- und Umweltmedizin (ZAUM) weiterentwickelt. Das Induktionsprotokoll sah vor zwei Probanden parallel zu induzieren. Im Anschluss folgten nochmals zwei Patienten, sodass an einem Studientag vier Probanden teilnehmen konnten. Zuerst wurden die Vitalparameter (Blutdruck und Puls) bestimmt und eine Lungenfunktion durchgeführt. Dabei wurde die Vitalkapazität (FVC), die Einsekundenkapazität (FEV1), der Tiffeneauwert (FEV1/FVC) und der max. expiratorische Fluss (MEF25) bestimmt. Anschließend wurde ein Pricktest durchgeführt mit einer Histamin- und NaCl-Probe als Validierungsmessung. Zudem wurde ein Serumröhrchen für die in-vitro Diagnostik abgenommen, sowie zwei weitere Vacutainer CPT™ für die PBMC Gewinnung. Die Vacutainer CPT™ wurden gleich nach Abnahme bei 3000 rpm, bei 20°C für 20 min. zentrifugiert, dadurch wurde das Probenmaterial für 24 Std. stabilisiert.

Zu Beginn der Sputuminduktion wurden drei Lungenfunktionsmessungen durchgeführt, gefolgt von einer Bronchospasmyse mit 400µg Salbutamol (β -Sympathomimetikum). Nach einer Einwirkzeit von 15 Min. schlossen sich drei weitere Lungenfunktionsmessungen an. Der höchste gemessene FEV1 Wert wurde bestimmt und als Richtwert festgelegt. Aus Sicherheitsgründen wurde definiert, dass kein folgender FEV1 Wert während der Induktion um mehr als 10% vom Richtwert abfallen durfte. Wurde ein Abfall um mehr als 10% registriert, schlossen sich drei weitere Lungenfunktionsmessungen an. Konnte der Abfall verifiziert werden, verabreichte man dem Patienten 200µg Salbutamol und die Sputuminduktion wurde abgebrochen. Bei einem Abfall um mehr als 20% wurde notfallmäßig 200µg Salbutamol gegeben und die Induktion abgebrochen.

Für die Sputuminduktion inhalierte der Patient über einen Ultraschallvernebler (Pariboy) hypertone Kochsalzlösung in aufsteigender Konzentration (3%, 4%, 5%) jeweils für 7 Minuten. Nach jedem Inhalationsvorgang wurden die Probanden gebeten sich den Mund zu spülen und die Nase sorgfältig zu putzen, um eine Verunreinigung mit Plattenepithelzellen zu verringern. Anschließend wurden die Probanden gebeten, Sputum durch kräftiges Husten zu mobilisieren und abzu husten. Es wurde besonders darauf Wert gelegt, den Probanden den Unterschied zwischen Sputum und Saliva zu verdeutlichen, um einer Verunreinigung mit Plattenepithelzellen vorzubeugen. Zudem zeigte sich, dass die Inhalation und Sputumexpektoration von allen Probanden ohne Komplikationen und Nebenwirkungen sehr gut toleriert wurde.

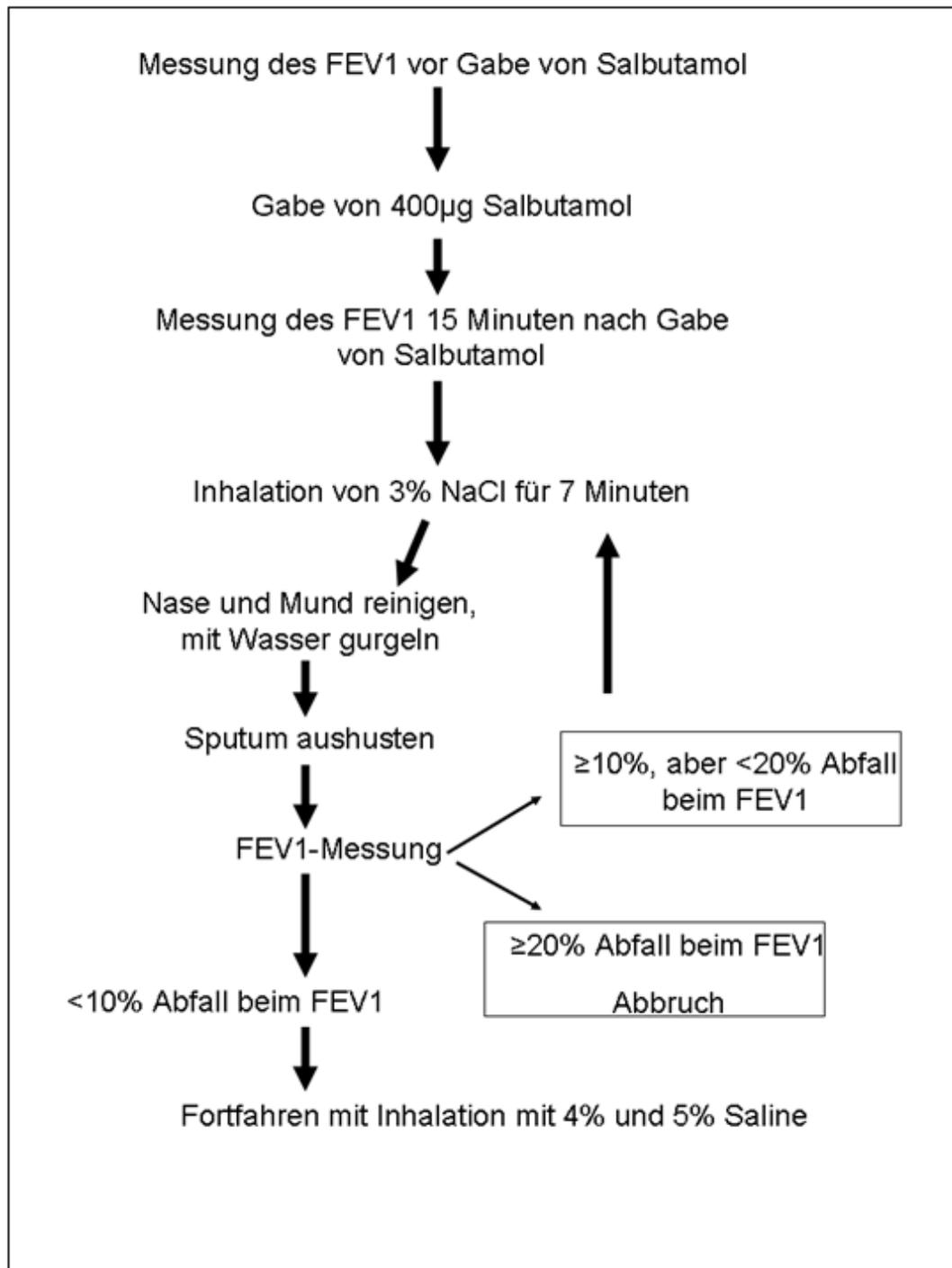


Abbildung 3.3: Flowchart der Sputuminduktion (Quelle:(Ziöbler, 2012))

3.4 Labortechnische Aufarbeitung von Sputum- und Blutproben

Anschließend an die Induktion wurde mit der Prozessierung des Sputums, nach einer maximalen Liegezeit von 2 Std. auf Eis, begonnen. Längere Standzeiten erhöhen die Gefahr, dass vermehrt Zellen absterben, sowie RNA und Proteindegenerationen stattfinden. Außerdem ist es unerlässlich, während des gesamten Aufarbeitungsprozesses, die Sputumproben auf Eis zu lagern. Nach Ermittlung der Gesamtsputummenge wurden die einzelnen Sputumplaques möglichst ohne Saliva per Pinzette in ein zuvor abgewogenes 50ml Falcontube überführt. Nach anschließender Gewichtsbestimmung wurde das vierfache einer 1:10 verdünnten Sputulysinlösung (verd. mit Milliporwasser) dazugegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Im folgenden Arbeitsschritt wurde die zweifache Menge an DPBS hinzugefügt und für 15 Sek. gevortext. Anschließend wurde die Sputumlösung durch ein 70µm Zellsieb filtriert. Nun wurde das Zellvolumen ermittelt und 10µl Zellsuspension zur Seite gelegt für die anschließende Zellzahlbestimmung. Die verbleibende Zellsuspension wurde bei 2000 rpm für 10 min. bei 4°C mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Es wurden je vier Aliquots pro Proband mit mindestens 200µl Überstand bei -80°C eingefroren, sowie je ein Aliquot mit 1000µl Überstand plus 1000µl Methanol. Nach der Probengewinnung wurde der restliche Überstand verworfen und das Zellpellet, mit der bei der Zellzählung bestimmten Menge an DPBS, aufgelöst. Die nun erhaltene Zellsuspension, mit einer fest eingestellten Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ /ml, war die Ausgangslösung für die Herstellung der Zytospins, sowie der Durchflusszytometrie-Färbung. Nach Entnahme der Zellen für diese beiden Analysen wurde die Suspension erneut zentrifugiert und das Zellpellet mit 1ml RNAprotect Cell Reagent bei -80°C eingefroren.

Die abzentrifugierten Vacutainer CPT™ stellten das Ausgangsprodukt für die Herstellung der PBMCs dar. Durch das Zentrifugieren wurden die Erythrozyten durch das Gel gepresst, somit trennte sich über der Gelphase das Blutserum mit den Leukozyten von den Erythrozyten ab. Diese Zellsuspension wurde in ein 50ml Falcontube überführt und anschließend bei 1800 rpm für 10 Min. bei 20°C zentrifugiert. Aus dem hier gewonnen Überstand wurden je Proband vier Aliquots mit mindestens 200µl Überstand bei -80°C eingefroren, sowie je ein Aliquot mit 1000µl Überstand plus 1000µl Methanol. Der Rest des Überstandes wurde verworfen und das Zellpellet mit 10ml DPBS resuspendiert. Diese neue Zellsuspension stellte nun den Ausgangspunkt für die Zellzählung der PBMCs und der darauffolgenden Antikörperfärbung und Analyse dar.

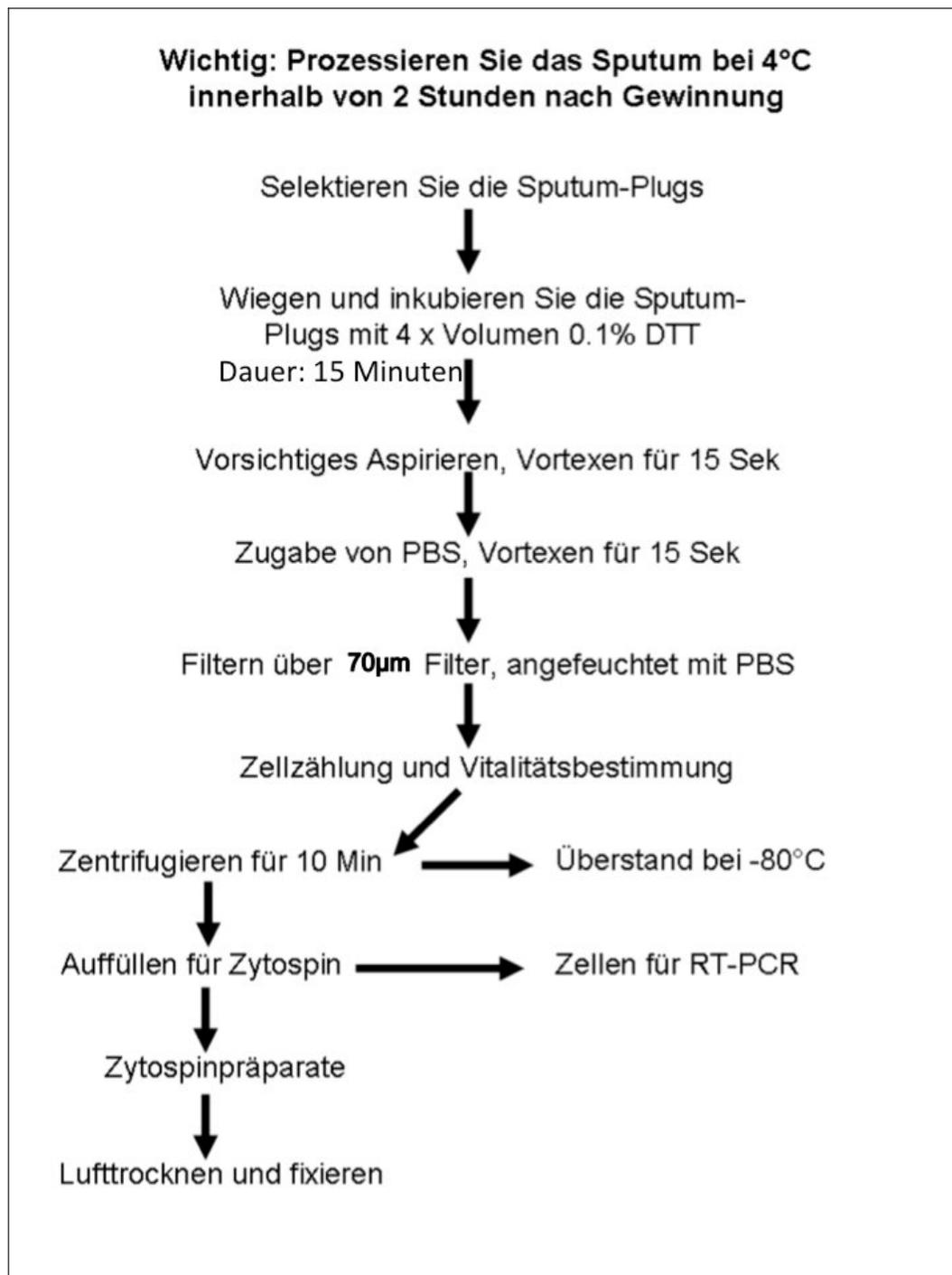


Abbildung 3.4: Flowchart der Sputumaufbereitung (Quelle:(Ziñler, 2012))

3.5 Zellzählung der Sputum- und PBMC-Proben

Für die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung des Sputums wurde die beiseite gelegte $10\mu\text{l}$ Zellsuspension mit $10\mu\text{l}$ Trypanblau gemischt. Nach zwei Minuten Einwirkzeit wurde $10\mu\text{l}$ der gefärbten Lösung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und mikroskopiert. Es wurden alle Zellen gezählt, differenziert nach Lebenden, Toten, sowie Plattenepithelzellen. Die Unterscheidung erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes, der in die tote Zellen eindrang und diese somit blau anfärbte. Lebende Zellen erschienen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Das Trypanblau sollte allerdings nicht länger als 5 Min. auf die Zellen wirken, da der Farbstoff selbst zytotoxisch wirkt. Die Zellzahl wurde in allen vier Quadranten bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet. Somit konnten verschiedene Kennzahlen berechnet werden, die die Qualität des Sputums klassifizierten. Außerdem konnte so das Volumen bestimmt werden, dass für die Resuspendierung notwendig war, um die definierte Zellzahl von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ zu erreichen.

Die Zellzahl wurde bei den PBMCs auch mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, allerdings wurde hier eine stärkere Verdünnung, mit $90\mu\text{l}$ Trypanblau für $10\mu\text{l}$ Zellsuspension, gewählt. Gezählt wurden alle lebenden Zellen. Anschließend wurde somit die Zellzahl pro ml Zellsuspension errechnet. Anhand dieses Wertes konnte das notwendige Verdünnungsvolumen an DPBS ermittelt werden, um die festgestellte Zellzahl von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ zu erhalten.

3.6 Zytospins

3.6.1 Herstellung

Als Ausgangspunkt für die Zytospinherstellung diente die definierte Sputumzellsuspension. Pro Proband wurden vier Zytospins angefertigt, je zwei mit $75\mu\text{l}$ und je zwei mit $100\mu\text{l}$. Die Slides wurden für 6 Min. bei 450 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden diese für 30 min. abgedunkelt getrocknet und für 5 Min. im Methanolbad fixiert.

3.6.2 Färbung

Als erstes wurde die Giemsa-Lösung im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und anschließend über einem Papierfilter gefiltert. Ebenso wurde die May-Grünwald Lösung filtriert. Im nächsten Schritt wurden je acht Slides zusammen in einer Färbewanne in der May-Grünwald Lösung für 8 Min. gefärbt und anschließend mit Leitungswasser gespült. Eine sorgfältige Entfernung aller Farbreste ist für die spätere Mikroskopierung unerlässlich. Anschließend wurden die Slides für 35 min. in der Giemsa-Lösung gefärbt und nach dem selben Prozess gewaschen. Nun wurden sie lichtgeschützt zum Trocknen aufbewahrt. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 10 Sek. in Xylol getaucht und getrocknet. Für die Eindeckelung applizierte man jeweils 3 Tropfen Eukitt auf das Slide, um es anschließend blasenfrei mit einem Deckgläschen zu verschließen. Eventuelle Rückstände wurden mit Aceton entfernt.

3.6.3 Differenzialzellbild

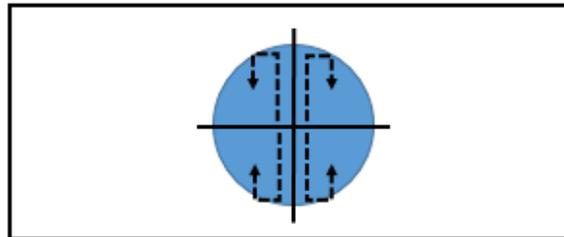


Abbildung 3.5: Auszählmethode der Zytospins

Zur Bestimmung des Differenzialzellbildes des Sputums wurden pro Kreuzfeld 100 Zellen (ohne squamöse Zellen) mäanderförmig in 100-facher Vergrößerung ausgezählt, insgesamt somit 400 Zellen. Um die Qualität und Aussagekraft der Zählung zu erhöhen, wurde jedes Slide von zwei unabhängigen Personen gezählt. Anschließend wurde aus den beiden Werten ein Durchschnittswert gebildet. Danach konnten die prozentualen Anteile an Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, neutrophilen-, eosinophilen- und basophilen Granulozyten berechnet werden. In den nun folgenden Abbildungen werden die einzelnen Zellidentitäten im Sputum näher beschrieben.

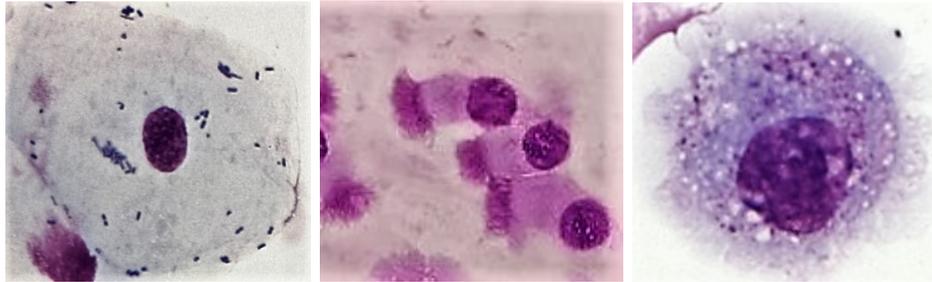


Abbildung 3.6: Plattenepithel (1.Bild); Flimmerepithel (2.Bild); Alveolarmakrophage (3.Bild) (Quelle:(Ziñler, 2012))

Plattenepithel:

Qualitativ hochwertiges Sputum besitzt einen Plattenepithelanteil von $< 20\%$. Sowohl die Mundhöhle, ausgekleidet mit mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel (vgl. S.347), als auch die Lungenalveolen, mit einschichtig unverhorntem Plattenepithel überzogen (Lüllmann-Rauch, 2009) (vgl. S.330), tragen zu der hohen Last an squamösen Zellen bei.

Flimmerepithel:

Flimmerzellen sind hochprismatische Zellen mit Kinozilien und Mikrovilli und zuständig für den Transport des Schleimteppichs Richtung oral (vgl. S.339). Eingeatmete Partikel über $10\mu\text{m}$ werden schon in den oberen Atemwegen abgefangen, Kleinere zwischen $5\text{-}8\mu\text{m}$ bleiben in der Trachea und den Bronchien hängen, die Kleinsten $<5\mu\text{m}$ hingegen gelangen bis in die Alveolen und werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert (Lüllmann-Rauch, 2009)(vgl. S.345).

Alveolarmakrophagen:

Sie gehören zum Monozyten-Phagozyten-System (MPS) und patrouillieren in den Alveolen und zilienfreien terminalen Luftwegen und räumen Staubpartikel, Keime, tote Zellen usw. ab (Lüllmann-Rauch, 2009)(vgl. S.345-346). Sie bilden mit $60\text{-}90\%$ den Hauptzellbestandteil im Sputum (Ziñler, 2012).

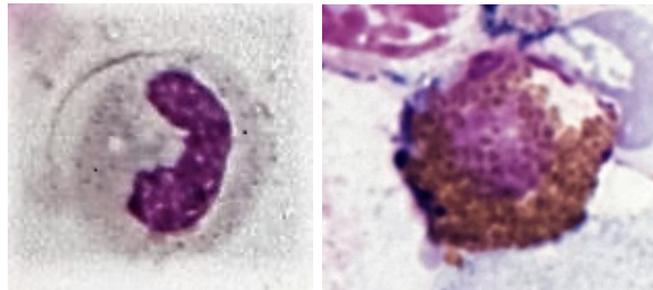


Abbildung 3.7: neutrophiler Granulozyt (1.Bild); eosinophiler Granulozyt (2.Bild) (Quelle:(Ziñler, 2012))

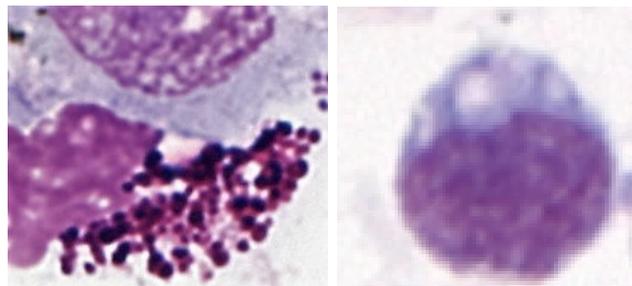


Abbildung 3.8: basophiler Granulozyt (1.Bild); Lymphozyt (2.Bild) (Quelle:(Ziñler, 2012))

Leukozyten (ca. $5000/\mu\text{l}$ Blut) bestehen aus drei Typen von Granulozyten, sowie Monozyten und Lymphozyten. Alle dienen der Abwehr gegen Pathogene. Da sie ihre Funktion nicht im Blut sondern weitestgehend im Interstitium ausüben, verlassen Leukozyten nach kurzer Zirkulationszeit (meist < 1 Tag) das Blut, um postkapilläre Venolen aktiv zu durchwandern. Orte mit stets relativ hohem Leukozytengehalt sind die Laminae propriae der Schleimhäute von Verdauungs- und Atemtrakt (Lüllmann-Rauch, 2009)(vgl. S.271). Dies ist der Grund, weshalb alle fünf Zellidentitäten im Sputum gefunden werden (Monozyten reifen zu Makrophagen).

Neutrophile Granulozyten:

Sie gehören zu den Hauptvertretern der natürlichen Abwehr gegen pathogene Bakterien die sie, mit Hilfe ihrer in Granula gespeicherten Stoffe, bekämpfen. Ihre Größe beträgt $10\text{-}12\mu\text{m}$ (Lüllmann-Rauch, 2009)(vgl. S.269 und S.272), sie bilden im Sputum einen Anteil an $1\text{-}40\%$ bei bronchialen Erkrankungen (Ziñler, 2012).

Eosinophile Granulozyten:

Sie dienen als Schutzfunktion durch die Vernichtung von Wurmparasiten mit der Freisetzung bakterieller und anti-viraler Stoffe aus ihren Granula. Durchschnittlich besitzen sie eine Größe von $12\mu\text{m}$ und sind reichlich in der Schleimhaut des Verdauungstraktes und der Atemwege vorhanden. Darüber hinaus spielen sie für den Verlauf verschiedener allergischer Erkrankungen (z.B. allergisches Asthma) eine wichtige Rolle (Lüllmann-Rauch, 2009) (vgl. S.269 und S.273).

Basophile Granulozyten:

Über die physiologische Funktion der Basophilen ist weniger bekannt, als über ihre pathophysiologische Bedeutung im Rahmen von allergischen Erkrankungen. Sie können wie Eosinophile durch Eotaxin zum Ort allergischer Reaktionen gelockt werden, um dort Histamin, Arachidonsäurederivate sowie Zytokine (z.B IL-4) auszuschütten, welche die Differenzierung von TH2-Lymphozyten fördern (Lüllmann-Rauch, 2009) (vgl. S.273).

Lymphozyten:

Funktionell lassen sich drei grundsätzlich verschiedene Population unterscheiden:

T-Lymphozyten (ca. 75%), B-Lymphozyten (ca. 15% der zirkulierenden Lymphozyten) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen, ca. 10%).

Diese einzelnen Subtypen lassen sich allerdings im üblichen Blutaussstrich nicht unterscheiden. Repräsentanten der adaptiven Abwehr sind die T- und B-Lymphozyten. Die meisten Lymphozyten halten sich in den lymphatischen Organen und im Interstitium auf, nur ein ganz kleiner Anteil an Lymphozyten (ca.2%) befinden sich jeweils für kurze Zeit (ca. 1 Stunde) im Blut. Im Allgemeinen rezirkulieren sie ständig vom Blut in die lymphatischen Organe oder ins Interstitium und über die Lymphe wieder zurück ins Blut (Lüllmann-Rauch, 2009) (vgl. S.275).

Normwerte zur Zelldifferenzierung im Sputum bei Erwachsenen (Zißler, 2012):

Makrophagen: 57-80%

Neutrophile Granulozyten: <35%

Eosinophile Granulozyten: <2%

Lymphozyten: <3%

3.7 Durchflusszytometrieanalyse

Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit stützt sich auf den Nachweis von Differenzierungsantigenen und geht damit weit über die einfachen oben genannten morphologischen Kriterien hinaus. Dabei handelt es sich um sogenannte “Marker“-Moleküle auf der Zelloberfläche, die mit Hilfe von Antikörpern, in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden können. Sie werden nach dem CD-System (“Cluster of Differentiation“) von CD1 bis inzwischen über CD300 nummeriert und besitzen physiologisch vielfältige Funktionen. Sie dienen als Erkennungs- oder Adhäsionsmoleküle, als Rezeptoren für Botenstoffe oder auch als Übermittler von Signalen. Neben diesem hier verwendeten wissenschaftlichen Nutzen dient das CD-System auch zur therapeutisch wichtigen Subklassifizierung von Leukämien, myeloproliferativen Syndromen und Lymphomen (Speckmann, Hescheler & Köhling, 2008)(vgl. S.317).

Dieses technische Verfahren der Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse genannt, wurde in dieser Arbeit angewandt, um die verschiedenen T- und B-Zellsubpopulationen zu detektieren. Durch Laserbestrahlung entstehen verschiedene Phänomene der Lichtemittierung und Streuung, da fluoreszenzmarkierte Antikörper angeregt werden. Die dabei entstehenden Emissionen von spezifischen Fluoreszenzspektren werden durch optische Filter auf Photosensoren gelenkt und in verschiedenen Kanälen gemessen. Die dabei emittierte Fluoreszenzintensität entspricht der Anzahl der Antikörper-Bindungsstellen. Nach Umwandlung dieser optischen in elektrische Signale können die Daten mit Hilfe von Auswertungsprogrammen wie z.B. FACS-Diva-Software analysiert werden.

3.7.1 Färbung mit Antikörpern

Für die FACS-Analyse wurden pro Proband vier Wells in einer 96-Well-Platte benötigt, jeweils zwei für Sputumzellen gefärbt/nicht gefärbt, sowie zwei für PBMCs gefärbt/nicht gefärbt. Beim Sputum wurden pro Well 0, 2×10^6 Zellen verwendet, bei den PBMCs 0, 5×10^6 . Nachdem die benötigten Zellsuspensionsmengen in die Wells pipettiert wurden, zentrifugierte man die Platte bei 1500 rpm für 4 Min. bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Um unspezifische Bindungen mit den Antikörpern zu vermeiden, wurden die Sputumzellen mit je 5 μ l Fc-Block in 95 μ l FACS-Puffer pro Well für 10 Min. bei 4°C inkubiert. Allerdings wurden jeweils pro Proband nur ein Well Sputum und ein Well PBMCs gefärbt, somit

hatte man in der folgenden FACS-Analyse immer auch ein Well mit ungefärbten Zellen, die als negativ Kontrolle dienten. Nach der Inkubation mit dem Fc-Block wurde wiederholt zentrifugiert, gefolgt von einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer.

Anschließend wurden die Zellen mit der frisch hergestellten Antikörperlösung versetzt. Dazu wurden pro zu färbendes Sputum-Well $44\mu\text{l}$ FACS-Puffer mit den je 12 verschiedenen Antikörperlösungen à $0,5\mu\text{l}$ vermischt. Für die PBMCs wurde eine halb so hohe Konzentration gewählt, $94\mu\text{l}$ FACS-Puffer wurde mit den je 12 Antikörperlösungen à $0,5\mu\text{l}$ vermischt und auf die Zellen gegeben. Diese inkubierten anschließend für 30 Min. bei 4°C lichtgeschützt. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde die Platte zentrifugiert und die Zellen in zwei weiteren Waschschriften gereinigt. Am Ende wurden die Wells mit je $200\mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgefüllt. Kurz vor der FACS-Messung wurde auf die gefärbten Wells von Sputum und PBMCs jeweils $2,5\mu\text{l}$ 7-AAD verdünnt in $7,5\mu\text{l}$ FACS-Puffer gegeben (insgesamt $10\mu\text{l}$). 7-AAD wurde in der anschließenden FACS-Analyse für die Unterscheidung zwischen lebend und toten Zellen verwendet. Allerdings ist der Farbstoff selbst zytotoxisch und sollte nicht länger als 15 Min. auf die Zellen einwirken, da sonst die Messergebnisse verfälscht werden.

3.7.2 Kompensation

Als Kompensation bezeichnet man das anteilige Abziehen einer sich bemerkbar machen den Fluoreszenz bei überlappenden Fluoreszenzspektren. Diese wurde sowohl in-season als auch out-season jeweils zu Beginn der Experimentserie durchgeführt und angelegt. Als Kontrolle zur Bestimmung der Positivität von Aktivierungsmarkern wurde das Prinzip der fluorescence minus one (genannt FMOs) und das der single colours eingesetzt. Die Kompensation wurde mit den an Beads gebundenen Antikörpern durchgeführt, um den Einfluss der Autofluoreszenz von Zellen auf die Kompensationseinstellungen entgegenzuwirken.

3.7.3 Antikörperwahl

Insgesamt wurden 13 Antikörper ausgewählt, die gegen verschiedenen Oberflächenmoleküle auf den Zellen binden. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Unterscheidung zwischen T- und B-Zellen. Bei der Wahl der Antikörper wurde darauf geachtet, dass sich die Lichtemissionen der Fluorochrome bestmöglich untereinander diskriminieren ließen. Im Folgenden eine kurze Zusammenfassung der Oberflächenmoleküle, gegen die in der Durchflusszytometrie Antikörper verwendet wurden.

Tabelle 3.5: Antikörperauswahl

| CD-Antigen | Zellen, die das Antigen exprimieren | Funktionen | Verwandtschaftsbeziehungen |
|------------|---|---|----------------------------|
| CD1d | dentritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen | MHC-Klasse-I-ähnliches Molekül, assoziiert mit β 2-Mikroglobulin, möglicherweise eine besondere Bedeutung bei der Antigenpräsentation | Immunglobulin |
| CD3 | Thymozyten, T-Zellen | Adhäsionsmolekül, das an CD58 bindet; bindet in der Zelle die Tyrosinkinase Lck und aktiviert T-Zellen | Immunglobulin |
| CD5 | Thymozyten, T-Zellen, eine Untergruppe von B-Zellen | moduliert B- und T- Zellinteraktionen und Signaltransduktionswege | Scavengerrezeptor |
| CD14 | myelomonozytische Zellen | Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein | |

| CD-Antigen | Zellen, die das Antigen exprimieren | Funktionen | Verwandtschaftsbeziehungen |
|------------|---|---|----------------------------|
| CD19 | B-Zellen | bildet Komplex mit CD21 und CD81; Corezeptor für B-Zellen - zytoplasmatische Domäne bindet Tyrosinkinasen im Zytoplasma und die PI-3-Kinase | Immunglobulin |
| CD23 | reife B-Zellen, aktivierte Makrophagen, eosinophile Zellen, folliculäre dendritische Zellen | niedrig affiner Rezeptor für IgE; reguliert IgE-Synthese | C-Typ-Lektin |
| CD25 | aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten | α -Kette des IL-2-Rezeptors | |
| CD27 | medulläre Thymozyten, T-Zellen, NK-Zellen und einige B-Zellen | bindet CD70; kann bei T- und B-Zellen als Costimulator wirken | TNF-Rezeptor |
| CD38 | frühe B- und T-Zellen, aktivierte T-Zellen, Keimzentren-B-Zellen, Plasmazellen | NAD-Glykohydrolase; verstärkt B-Zell-Proliferation | |
| CD45 | alle hämatopoetischen Zellen | Tyrosinphosphatase; erhöht die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T- Zellen; durch alternatives Spleißen entstehen viele Unterformen | Fibronectin Typ-III |
| CD138 | B-Zellen | Heparansulfatproteoglykan, bindet Kollagen Typ I | |
| 7-AAD | | Zellfarbstoff, der ausschließlich die DNA von nicht-viablen Zellen färbt | |

Quelle: (Murphy et al., 2009) (Wood & Freudenthal, 1992)

3.7.4 Sputum-Panel

Um über die Oberflächenmoleküle (CD-Strukturen) auf den Zellen die Klassifizierung von verschiedenen Lymphozytengruppen zu ermöglichen, wurde ein Panel mit 13 verschiedenen Antikörpern verwendet (siehe Tabelle 3.5). Hierbei lag der Fokus besonders auf einer näheren Klassifizierung der Lymphozytenuntergruppen. Somit entstanden zwei verschiedene Gating-Strategien, um T- und B-Zellen näher zu charakterisieren. Wichtig für einen vergleichenden Auswertungsprozess ist ein identisches Gatingmuster, welches sowohl auf die Sputum- als auch PBMC-Daten angewandt wurde. Dieses Vorgehen lässt somit einen direkten Vergleich der lokalen sowie der systemischen Inflammation zu.

Es wurden standardisiert von beiden Materialien 1.0×10^5 Zellen durchflusszytometrisch charakterisiert, wobei das initiale Gating auf die Lymphozyten-Population, die Eingrenzung auf einzelne Zellen (Singletten) und auf die lebenden Zellen von übergeordneter Priorität war. Eine weitere Verifizierung der Lymphozyten-Population konnte über den Einsatz des Pan-Leukozytenmarkers CD45 erreicht werden, welcher ubiquitär auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert wird. Somit entstanden zwei verschiedene Gating-Strategien, um T- und B-Zellen näher zu charakterisieren. Wichtig für einen vergleichenden Auswertungsprozess ist ein identisches Gatingmuster, welches sowohl auf die Sputum- als auch die PBMC-Daten angewandt wurde. Gerade im Vergleich zeigten sich interessante Aspekte.

Soweit genug Material vorhanden war, wurden immer 100.000 Events pro Probe von Sputum und PBMCs eingelesen. Als erstes wurden die Singletten bestimmt. Als nächstes wurde der Zellbruch von den intakten Zellen getrennt und anschließend mit Hilfe des 7-AAD Antikörpers die lebende Zellpopulation definiert. Als Pan-Leukozytenmarker wurde CD45 verwendet, mit dessen Hilfe die Lymphozytenpopulation zugeordnet wurde. Mit Hilfe des Vorwärts- und Seitwärtsscatters wurde in einem weiteren Gate eventueller Zellbruch abgetrennt.

Mit der Auftragung der so gewonnen Zellpopulation gegen CD5,CD3/CD19 wurde es möglich die B- und T-Lymphozyten zu bestimmen. Die als Leukozyten identifizierten Zellen wurden einem Sub-Gating unterzogen. Die T- und B-Lymphozytenpopulationen wurden anhand ihrer charakteristischen Oberflächenmarker CD3/CD5 (T-Zellen) sowie CD19 (B-Zellen) unterteilt, welche von der jeweils anderen Zellpopulation nicht exprimiert werden. Die folgende Analyse spezialisiert sich nun auf die Subpopulationen innerhalb der B- und T-Zellen.

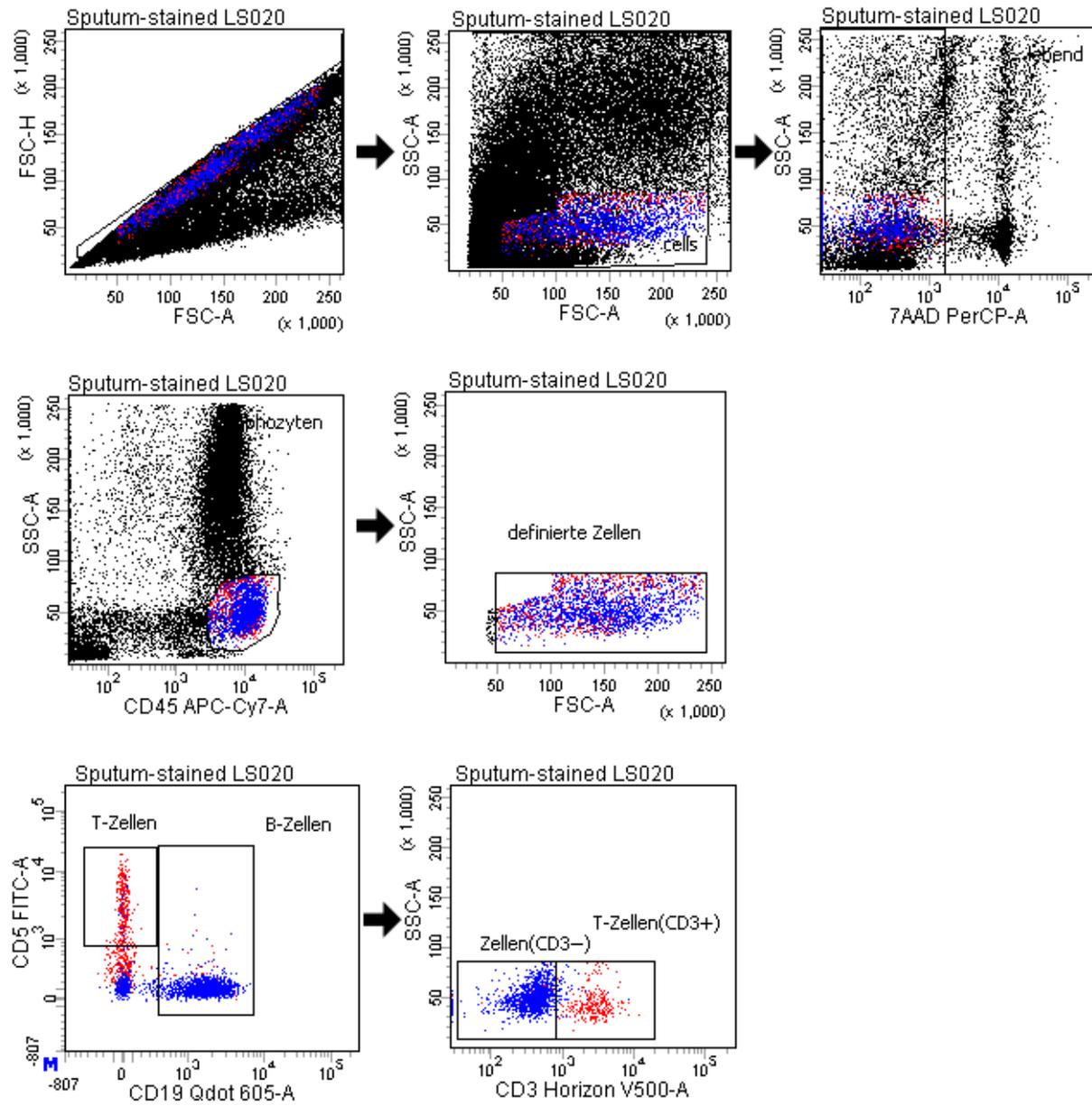


Abbildung 3.9: Beispiel für die allgemeine Gatingstrategie: Sputum

T-Zellpopulationen

Bei den T-Zellen entschied man sich für drei weitere Gates. Im ersten Gate wurde die CD3+/CD5+ T-Zellpopulation auf das Vorhandensein des Oberflächenmoleküles CD25 überprüft. Innerhalb dieser Zellpopulation CD3+/CD5+/CD25+ lassen sich die in mehreren Veröffentlichungen beschriebenen T-regulatorische Zellen finden (Santegoets et al., 2015) (Xystrakis, Urry & Hawrylowicz, 2007). Daneben sollte die Präsenz und Frequenz weiterer wichtiger T-Zell-Subpopulationen wie CD3+/CD38+ aktivierte T-Lymphozyten (Maecker, McCoy & Nussenblatt, 2012) sowie CD3+/CD27- entdifferenzierte T-Zellen (Wambre et al., 2012) dargestellt werden. Liegen beide Marker in folgendem Expressionsmuster: CD27-/CD38+ vor, spricht man von sogenannten Effektorzellen. In einem weiteren Gate wurde isoliert die Population der CD5+/CD38+, somit aktivierten, T-Zellen betrachtet (Maecker et al., 2012).

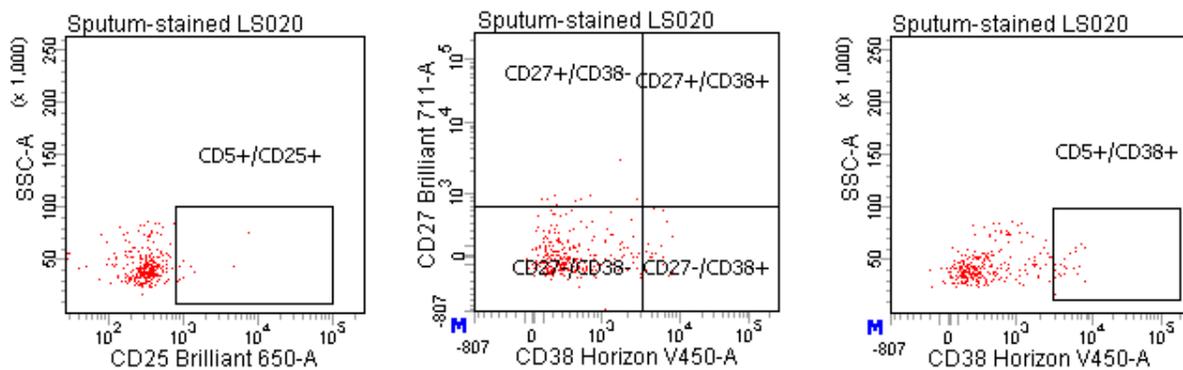


Abbildung 3.10: T-Zell-Gatingstrategie: Sputum

B-Zellpopulationen

Bei den B-Zellen wurde in insgesamt 8 verschiedenen Gates nach Subpopulationen gescreent. Im ersten Gate wurde die CD19+ Population gegen CD27 aufgetragen. Hierbei ergaben sich zwei unterschiedliche Gruppen, CD19+/CD27+ Memory B-Zellen und die CD19+/CD27- naiven B-Zellen (Agematsu, 2000), die jeweils eine eigene Subpopulation darstellen. In einem zweiten Gate wurden die CD19 positiven Zellen gegen CD5 aufgetragen. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Subpopulation, den B1a-B-Zellen, die normalerweise im Peritoneum und in der Pleura vorzufinden sind (Düber et al., 2009). Das CD19+/CD23+ Gate stellte eine weitere B-Zellidentität dar. Bei den CD19+/CD138+ Zellen handelt es sich um Plasmazellen (Costes et al., 1999) (Chilosi et al., 1999). Bei den letzten vier Gates wurde versucht die heterogene Gruppe der B-regulatorischen Zellen darzustellen. Hier wurden bereits in einigen Veröffentlichung verschiedene Marker vorgeschlagen, die für eine Klassifizierung der B-regulatorischen Zellen dienen könnten. In dem verwendeten Panel wurde nach den CD19+/CD1d+, CD19+/CD1d+/CD5+ (Matsushita, Yanaba, Bouaziz, Fujimoto & Tedder, 2008) (Yanaba et al., 2008), CD19+/CD24+/CD38+ (Blair et al., 2010) und den CD19+/CD24hi/CD27+ (Iwata et al., 2011) B-Zellpopulationen gescreent.

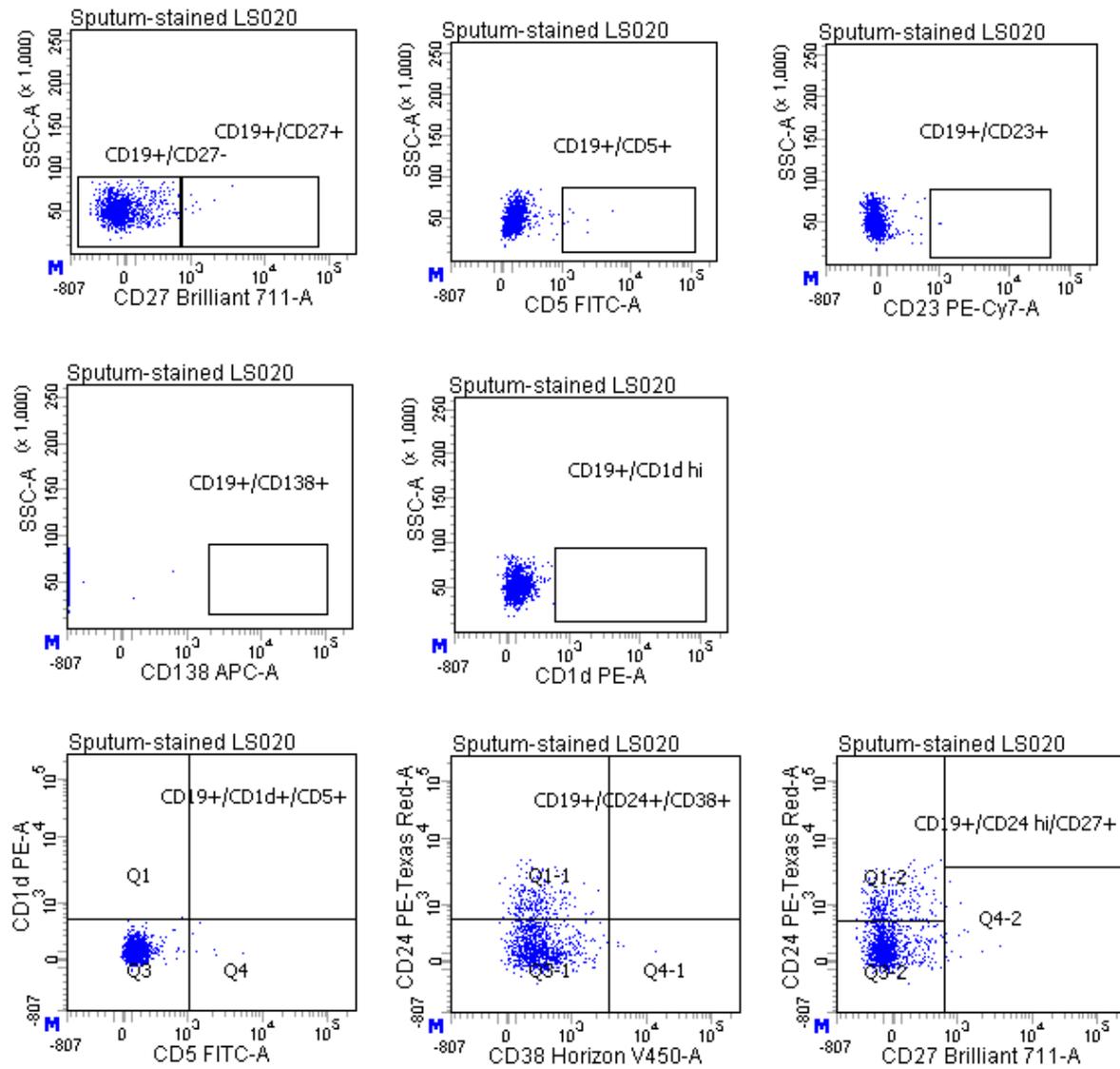


Abbildung 3.11: B-Zell-Gatingstrategie: Sputum

3.7.5 PBMC-Panel

Die gleiche Gatingstrategie, die bei der Auswertung der Sputum-FACS-Daten Verwendung fand, wurde auch für die Analyse der peripheren venösen Blutzellen benutzt.

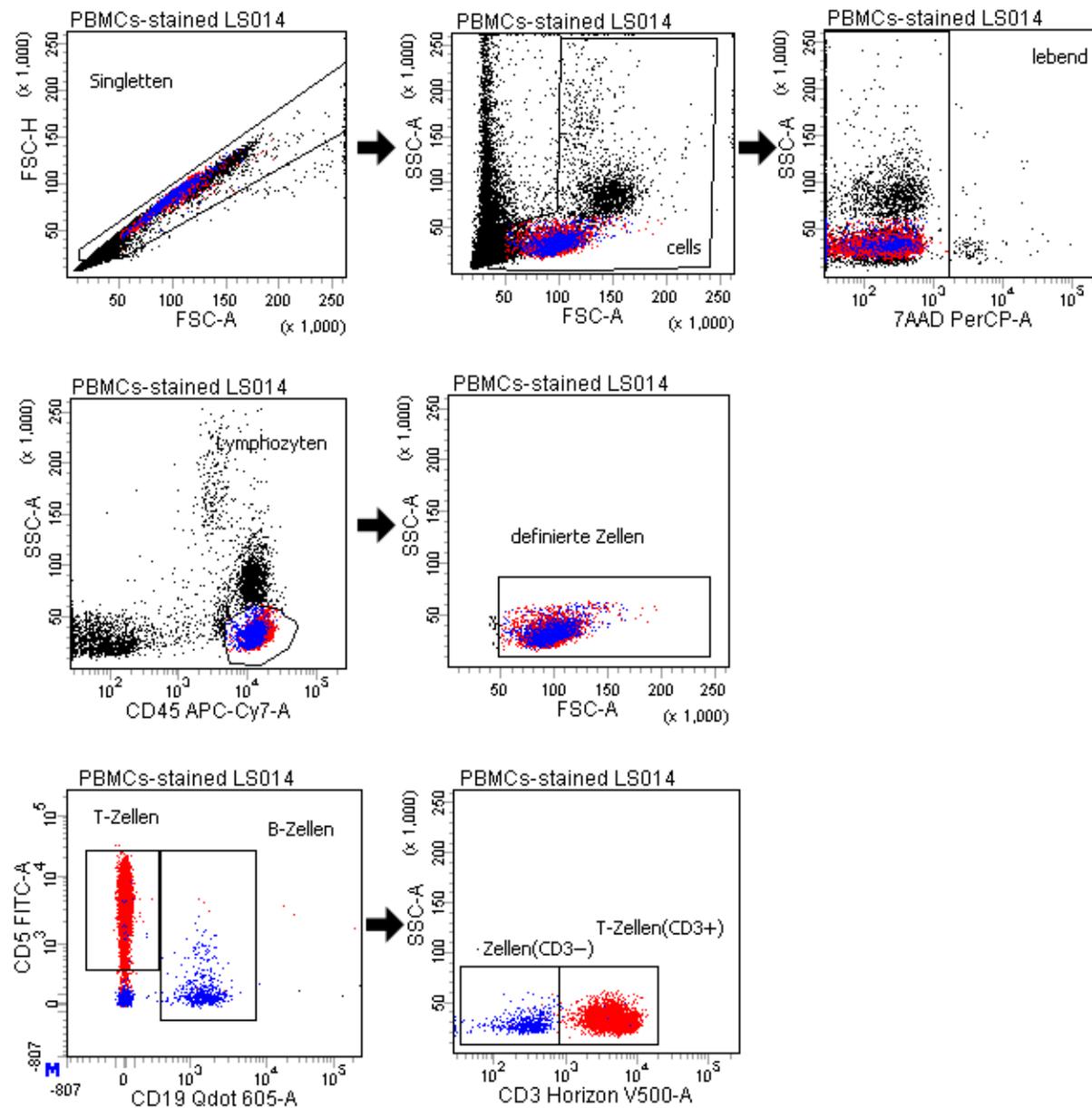


Abbildung 3.12: allgemeine Gatingstrategie: PBMC

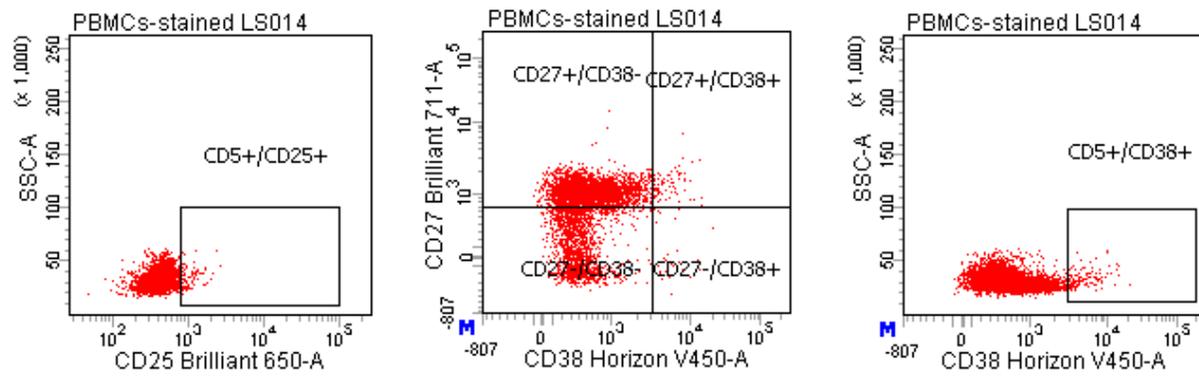


Abbildung 3.13: T-Zell-Gatingstrategie: PBMC

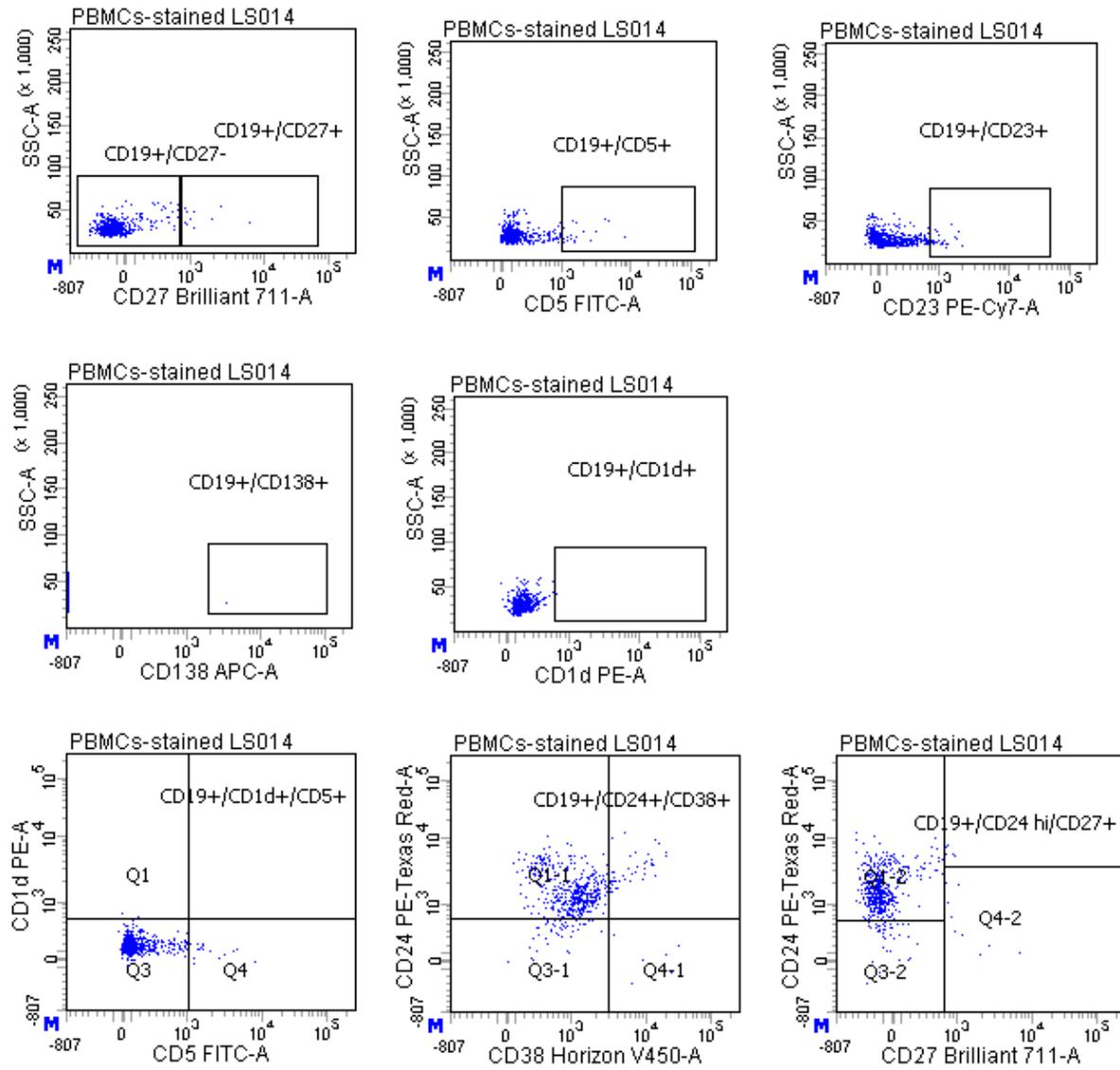


Abbildung 3.14: B-Zell-Gatingstrategie: PBMC

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde ausschließlich das Computerprogramm GraphPad-Prism verwendet. Wie auf der folgenden Abbildung ersichtlich, gibt es die Möglichkeit, die absoluten Zellzahlen (hier genannt: #Events) oder die relativen Zellzahlen (hier genannt: %Parent) auszuwerten. Man entschied sich für die relativen Zellzahlen. Eine ausführliche Erklärung folgt im Ergebnis- und Diskussionsteil.

Statistisch wurde ein unverbundener Test verwendet, um einen Vergleich zwischen zwei Gruppen (z.B.: Kontrollen vs. Allergiker oder Asthma-/SCIT- vs. Asthma+/SCIT+) zu erstellen. Hierbei handelt es sich um eine quantitative Zielgröße. Somit ist die Normalverteilung innerhalb der Gruppe entscheidend für die Wahl des geeigneten Testes. Diese wurde mit dem D'Agostino & Pearson Test bestätigt. Bei Normalverteilung wurde der t-Test für unverbundene Stichproben gewählt. Lag diese nicht vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test (rangbasiert) verwendet. Ein verbundener Test wurde verwendet, um quantitative Änderungen der Zielgröße innerhalb einer Gruppe (z.B.: Kontrollen i.s. versus Kontrollen o.s.) zu erfassen. Auch hier ist die Normalverteilung entscheidend für die Wahl des Testes. Konnte diese angenommen werden, wurde der t-Test für verbundene Stichproben gewählt, ansonsten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test.

Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen untereinander, wurde die einfaktorielle ANOVA verwendet. Auch hier ist Normalverteilung Voraussetzung, somit kann die ANOVA auch als Verallgemeinerung des t-Testes für mehr als zwei Gruppen betrachtet werden. Als post-hoc-Test wurde der Dunnett's-Test verwendet. Waren die Daten nicht parametrisch verteilt, wurde der Kruskal-Wallis-Test gewählt, mit dem Dunn's post-hoc-Test. Um Zu-

sammenhänge von Häufigkeiten bestimmter Zellpopulationen (CD25+; CD27-/CD38+) mit den klinischen Daten zu verdeutlichen, wurde entweder eine Korrelation mit dem Spearman- oder Pearson- Korrelationskoeffizient, je nachdem ob ein lineare Zusammenhang und Normalverteilung bestand, angewandt.

Statistische Signifikanz liegt bei $p < 0.05$ vor, gekennzeichnet durch “*” in den Diagrammen, “**” bedeutet $p < 0.0001$. Die Daten in den Abbildungen sind weitestgehend als Mediane mit Interquartilbereich oder als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

| Population | #Events | %Parent | %Total |
|---------------------|---------|---------|--------|
| All Events | 100,000 | ### | 100.0 |
| Singletten | 19,030 | 19.0 | 19.0 |
| cells | 8,963 | 47.1 | 9.0 |
| lebend | 8,921 | 99.5 | 8.9 |
| Lymphozyten | 5,519 | 61.9 | 5.5 |
| definierte Zellen | 5,502 | 99.7 | 5.5 |
| T-Zellen | 4,135 | 75.2 | 4.1 |
| CD5+/CD25+ | 51 | 1.2 | 0.1 |
| CD27+/CD38- | 3,152 | 76.2 | 3.2 |
| CD27+/CD38+ | 181 | 4.4 | 0.2 |
| CD27-/CD38- | 779 | 18.8 | 0.8 |
| CD27-/CD38+ | 23 | 0.6 | 0.0 |
| CD5+/CD38+ | 240 | 5.8 | 0.2 |
| B-Zellen | 917 | 16.7 | 0.9 |
| CD19+/CD27+ | 93 | 10.1 | 0.1 |
| CD19+/CD27- | 817 | 89.1 | 0.8 |
| CD19+/CD5+ | 5 | 0.5 | 0.0 |
| CD19+/CD23+ | 81 | 8.8 | 0.1 |
| CD19+/CD138+ | 0 | 0.0 | 0.0 |
| CD19+/CD1d+ | 0 | 0.0 | 0.0 |
| Q1 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| CD19+/CD1d+/CD5+ | 0 | 0.0 | 0.0 |
| Q3 | 912 | 99.5 | 0.9 |
| Q4 | 5 | 0.5 | 0.0 |
| Q1-1 | 719 | 78.4 | 0.7 |
| CD19+/CD24+/CD38+ | 7 | 0.8 | 0.0 |
| Q3-1 | 179 | 19.5 | 0.2 |
| Q4-1 | 12 | 1.3 | 0.0 |
| Q1-2 | 687 | 74.9 | 0.7 |
| CD19+/CD24 hi/CD27+ | 8 | 0.9 | 0.0 |
| Q3-2 | 117 | 12.8 | 0.1 |
| Q4-2 | 105 | 11.5 | 0.1 |
| T-Zellen(CD3+) | 4,135 | 75.2 | 4.1 |
| Zellen(CD3-) | 1,363 | 24.8 | 1.4 |

Abbildung 4.1: Beispiel der Auswertegraphik

4.2 Klinische Daten

4.2.1 Sputumqualität

Als Sputum wird die abgehustete Sekretion der unteren Atemwegsschleimhaut bezeichnet, bestehend aus einer heterogenen Zellpopulation, wie Leukozyten, Epithelzellen und auch Alveolarmakrophagen. Nebenbei kann Sputum mit Saliva, Pus oder Blut versetzt sein. Somit ist Sputum ein schwierig zu analysierendes biologisches Material, da sich hohe Verunreinigungen mit Epithelzellen störend auf die Analyse mittels Durchflusszytometrie auswirken können. Der Anteil an Plattenepithelzellen konnte signifikant durch die Einhaltung der modifizierten Sputum-SOPs gesenkt werden, veröffentlicht in der Dissertation von Dr. U.M.Zissler (Zißler, 2012). Wichtig ist eine rasche, auf Eis gekühlte Aufbereitung des Sputums innerhalb von zwei Stunden, um den Anteil an toten Leukozyten möglichst gering zu halten.

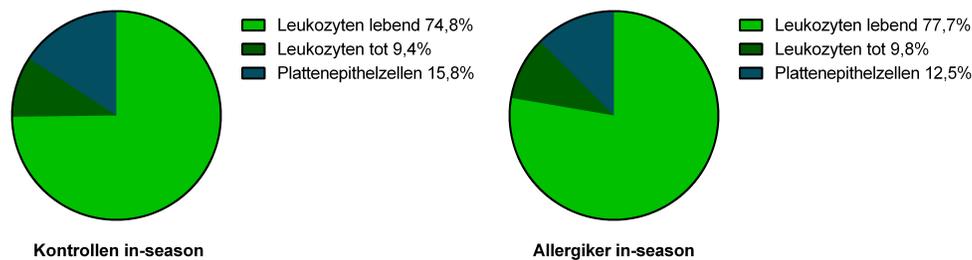


Abbildung 4.2: Vergleich der mittleren prozentualen Zellverteilung im aufgereinigten Sputum

Es konnten keine Unterschiede zwischen Proben während der Pollensaison und außerhalb in Bezug auf die Vitalität festgestellt werden, die Anteile waren relativ konstant (Mittelwert, Kontrollen: lebende Leukozyten 74,7%, tote Leukozyten 10,5%, Plattenepithelzellen 14,8%, Allergiker: lebende Leukozyten 79,2%, tote Leukozyten 8,5%, Plattenepithelzellen 12,3%)

Während des Aufreinigungsprozesses wurde außerdem die Gesamtleukozytenzahl im Sputum mittels Neubauer-Zählkammer und vorhandenem Sputumvolumen bestimmt.

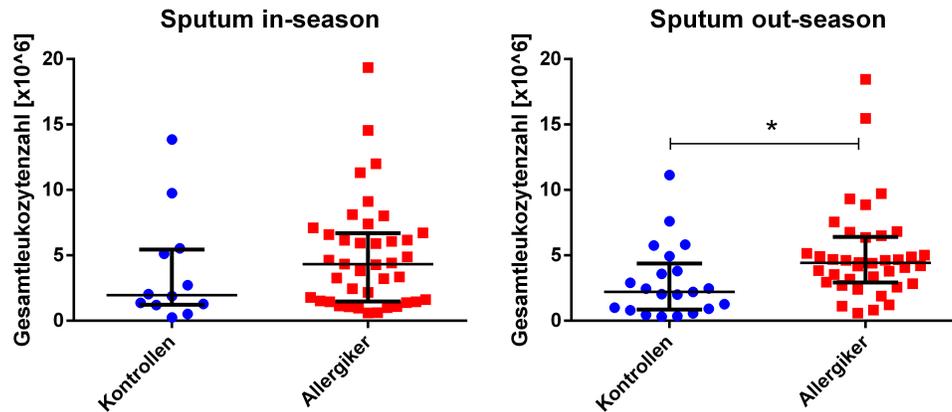


Abbildung 4.3: a) Vergleich der Gesamtleukozytenzahl

Dabei wird ersichtlich, dass Allergikersputum (Median: i.s.= $4,32 \times 10^6$, o.s.= $4,43 \times 10^6$) eine höhere Gesamtleukozytenzahl besitzt als das gesunder Probanden (Median: i.s.= $1,96 \times 10^6$, o.s.= $2,20 \times 10^6$). Signifikant wird dieses Ergebnis außerhalb der Pollenbelastung, getestet mit dem Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$). Die Werte der Graphik sind als Mediane mit Interquartilbereich dargestellt.

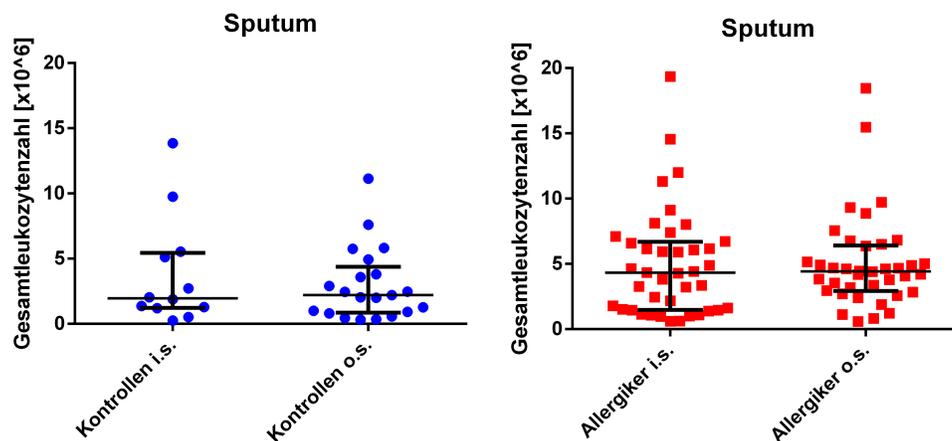


Abbildung 4.4: b) Vergleich der Gesamtleukozytenzahl

Zusammenfassend unterscheidet sich die Gesamtleukozytenzahl innerhalb der Kontrollen und der Allergiker in- und out-season nicht, d.h. die Werte bleiben in den Gruppen

relativ konstant. Die Werte der Graphen sind als Mediane mit Interquartilbereich dargestellt.

Des Weiteren wurde der Zusammenhang der Gesamtleukozytenzahl mit dem Geschlecht untersucht, da bei der Sputuminduktion subjektiv auffiel, dass männliche Probanden leichter induziertes Sputum abhusten können.

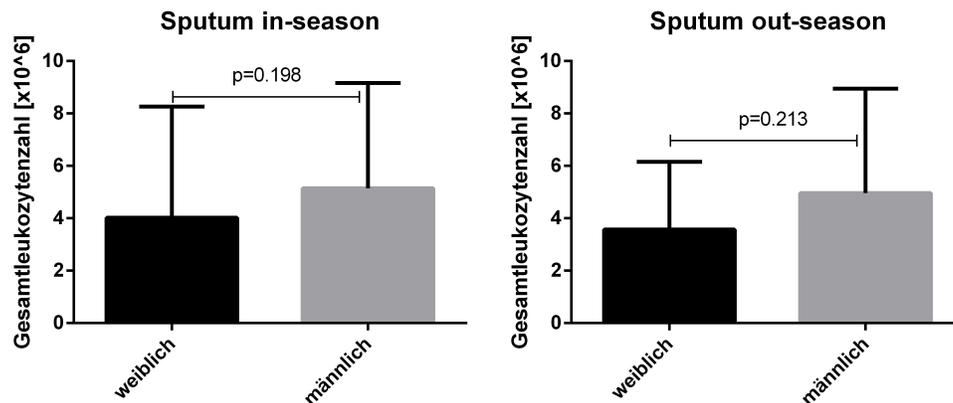


Abbildung 4.5: Vergleich der Gesamtleukozytenzahl mit dem Geschlecht

Diese subjektive Vermutung lässt sich bestätigen, da das Sputum männlicher Probanden durch die größere Zellzahl qualitativ hochwertiger ist. Allerdings ist der geschlechter-spezifische Unterschied der Gesamtleukozytenzahl statistisch nicht signifikant (Median i.s.: weibl.= $4,03 \times 10^6$, männl.= $5,15 \times 10^6$, Median o.s.: weibl.= $3,57 \times 10^6$, männl.= $4,96 \times 10^6$), getestet mit Mann-Whitney-U-Test ($p > 0.05$).

4.2.2 Korrelation mit Lungenfunktionsdaten

Zu Beginn der Sputuminduktion wurde von jedem Patienten dreimal die Lungenfunktion gemessen. Anhand dieser Daten lässt sich der auf die Vitalkapazität bezogene Tiffeneau-Wert berechnen. Er wird als relative Einsekundenkapazität bezeichnet und beträgt im Normalfall $\geq 75\%$. FEV1 ist ein Parameter für die Obstruktion der intrathorakalen Atemwege und entsprechend bei obstruktiven Erkrankungen, wie Asthma bronchiale, vermindert.

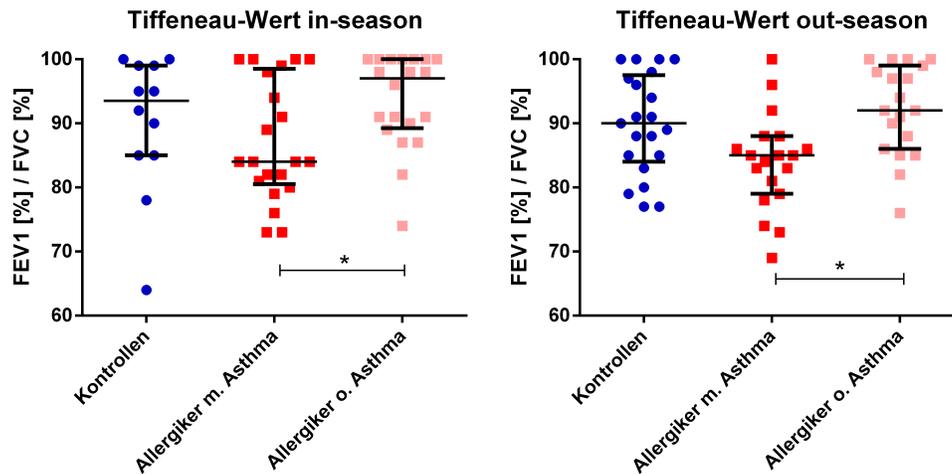


Abbildung 4.6: Vergleich der Tiffeneau-Werte in- und out-season

Die Tiffeneau-Werte der Allergiker mit Asthma (Median i.s.=84,0; o.s.=85,0) unterscheiden sich signifikant zu den Werten der Allergiker ohne Asthma (Median i.s.=97,0; o.s.=92,0), sowohl in- (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0.05$) als auch out-season (ungepaarter t-Test; $p < 0.05$). Da alle Werte bei den Asthmatikern über 70% liegen, bestätigt sich das Ergebnis des GINA-Testes. Gemäß diesem litten alle Asthmatiker an einem "kontrollierten Asthma", dies stellte eine Voraussetzung zur Teilnahme dar.

4.2.3 Korrelation mit dem mRQLQ

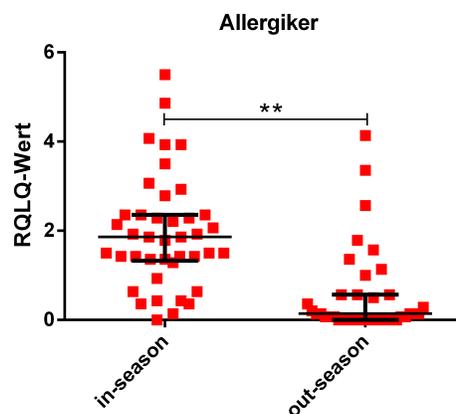


Abbildung 4.7: Vergleich der mRQLQ-Werte in- und out-season

Subjektiv fühlen sich Allergiker während der Pollensaison durch ihre allergische Erkrankung stärker negativ beeinträchtigt. Der mRQLQ-Wert, der objektiv anhand von Fragen die Lebensqualität bewertet, zeigt dabei höhere Werte, ein Surrogat für verminderte Lebensqualität durch vermehrte Beschwerden (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.0001$).

4.3 Durchflusszytometriedaten

4.3.1 Allgemeine Ergebnisse

In Bezug auf die erste Fragestellung konnte gezeigt werden, dass die technische Expertise vorhanden ist um Sputum in guter Qualität durchflusszytometrisch zu untersuchen, trotz materialbezogener Schwierigkeiten.

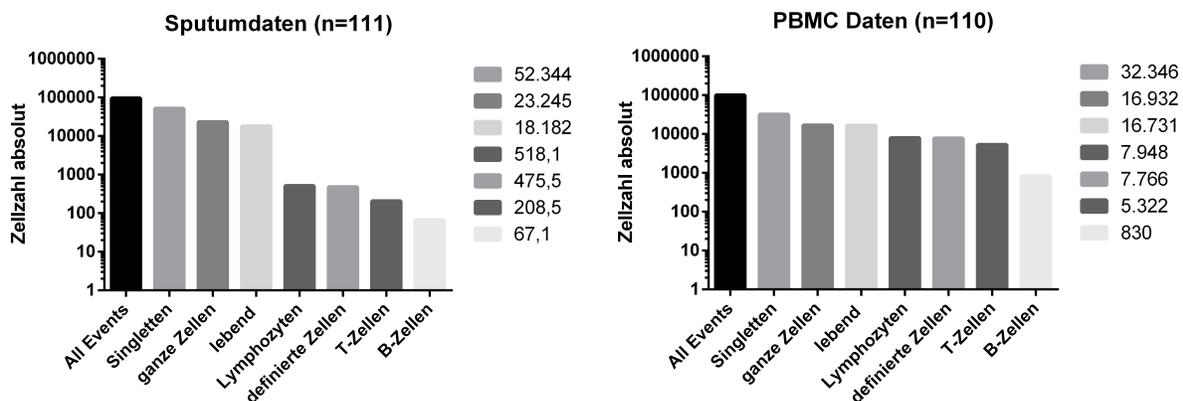


Abbildung 4.8: Vergleich der absoluten Zellzahlen

Die größte Schwierigkeit stellt der hohe Zellausschuss beim Sputum dar. Angefangen bei 100.000 Zellaufnahmen pro Patient erreicht man bei den Lymphozyten nur eine durchschnittliche Zellzahl von 518 Zellen (Vergleich PBMC Mittelwert: 7948 Lymphozyten). Bei den T-Zellen erhält man durchschnittlich 209 Zellen (PBMC 5322), bei den B-Zellen 67 Zellen (PBMC 830).

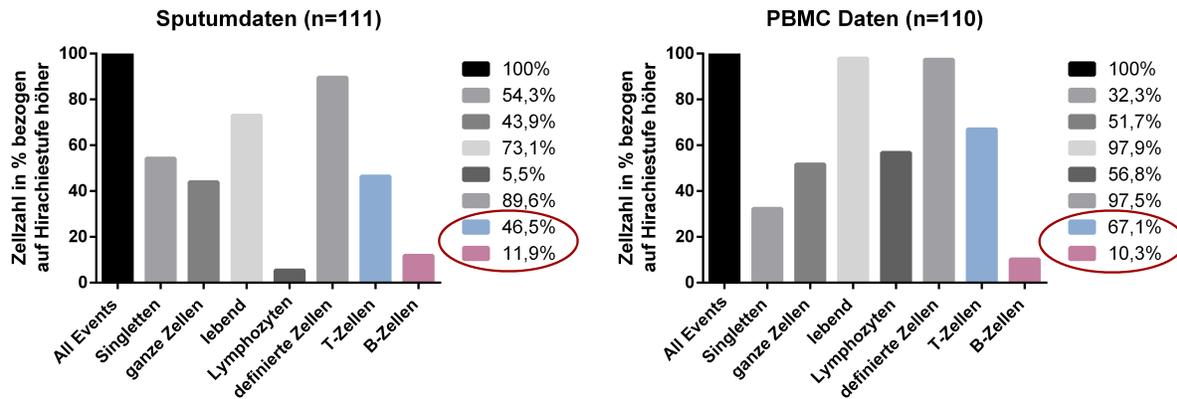


Abbildung 4.9: Vergleich der relativen Zellzahlen

Die beiden Abbildungen verdeutlichen, dass die relativen Zellzahlen von T- und B-Zellen zwischen Sputum und PBMCs vergleichbar sind und somit alle folgenden Subpopulationen auch. Im Durchschnitt erhält man 5,5% Lymphozyten an den gesamtlebenden Zellen im Sputum, bei den PBMCs hingegen Werte um die 56,8%. Ein Grund hierfür ist, dass im Sputum noch reichlich andere Zellpopulationen wie Alveolarmakrophagen und Plattenepithel existieren und somit den Durchschnittswert der Lymphozyten proportional sinken lassen. Bei den PBMCs ist der Wert der Lymphozyten hingegen überproportional groß, da die neutrophilen Granulozyten, die eigentlich einen Großteil der Leukozyten darstellen, überproportional schneller absterben und bei den lebenden Zellen nicht mehr erfasst werden. Aus diesem Grund besteht ein Großteil der lebenden Zellen aus Lymphozyten. Betrachtet man allerdings die T-Zell- (Sputum 46,5%, PBMC 67,1%) und die B-Zellpopulation (Sputum 11,9%, PBMC 10,3%) bestätigt sich die Hypothese, dass eine prozentuale Analyse der T- und B-Zellsubpopulation im Sputum sowie der Vergleich mit den PBMCs möglich ist. Schlussfolgernd gewinnt man die Erkenntnis, dass eine weitere Charakterisierung der relativen Zellzahlen sinnvoll ist. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten aller Probanden ohne Saison- und Gruppeneinteilung im Mittelwert.

4.3.2 Durchflusszytometrische Phänotypisierung von Sputumzellen

Phänotypisierung von T-Zellsubpopulationen

a) T-Zellen im Sputum

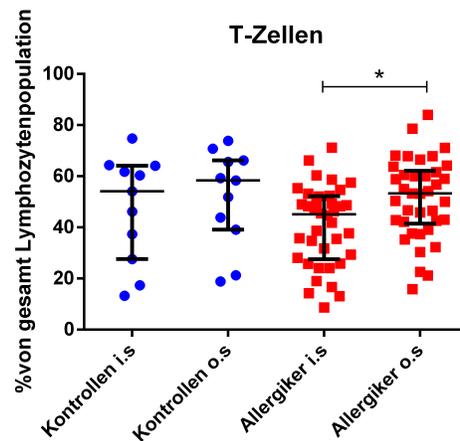


Abbildung 4.10: Relative T-Zellzahlen in- und out-season

Die relative T-Zellzahl unterscheidet sich bei den Allergikern signifikant zwischen in- (Median 45,2%) und out-season (Median 53,3%) (gepaarter t-Test; $p < 0.05$). Dieser Effekt zeigt sich bei den Kontrollen nicht (gepaarter t-Test; $p = 0.366$).

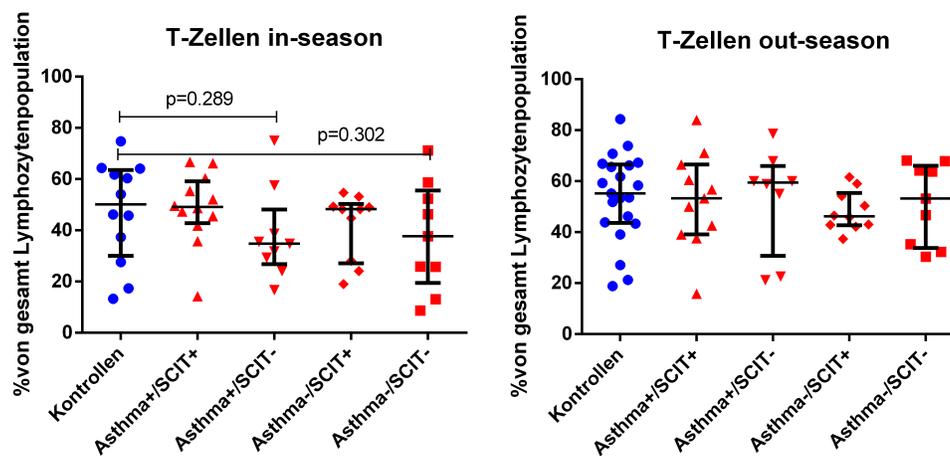


Abbildung 4.11: Vergleich der T-Zellverteilung in den Subgruppen

Im Diagramm während der Pollensaison fällt auf, dass Allergiker ohne einer Immuntherapie (Median: Asthma+/SCIT- 34,8%, Asthma-/SCIT- 37,7%, Kontrollen 50,2%) tendenziell einen niedrigeren Prozentsatz an T-Zellen besitzen. Dies ist statistisch allerdings nicht signifikant (ungepaarter t-Test $p > 0.05$). Dieser Effekt zeigt sich außerhalb der Allergiesaison nicht.

b) mögliche T-regulatorische Zellen im Sputum

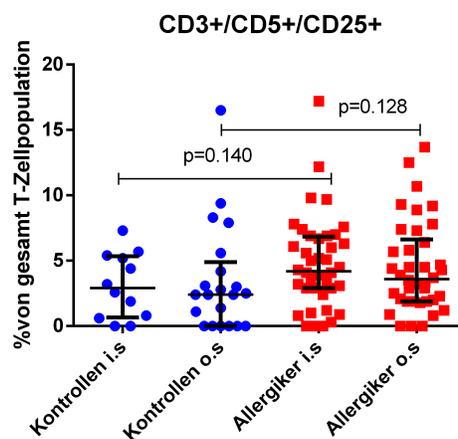


Abbildung 4.12: Relative T-regulatorische Zellzahlen in- und out-season

Allergiker besitzen, sowohl in- (Median: 4,2%) als auch out-season (Median: 3,6%) prozentual, mehr CD3+/CD5+/CD25+ T-Zellen als Kontrollen (Median; i.s.=3,2%, o.s.=3,1%). Innerhalb der CD3+/CD5+/CD25+ Population befinden sich die T-regulatorischen Zellen, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird. Dieser Effekt ist statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p > 0.05$), allerdings zeigt sich eine deutliche Tendenz. Mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde untersucht, ob sich ein signifikanter Unterschied bei den Kontrollen i.s. versus Kontrollen o.s. oder den Allergiker i.s. versus Allergiker o.s. zeigt. Allerdings bestätigt sich dieser Sachverhalt nicht ($p > 0.05$).

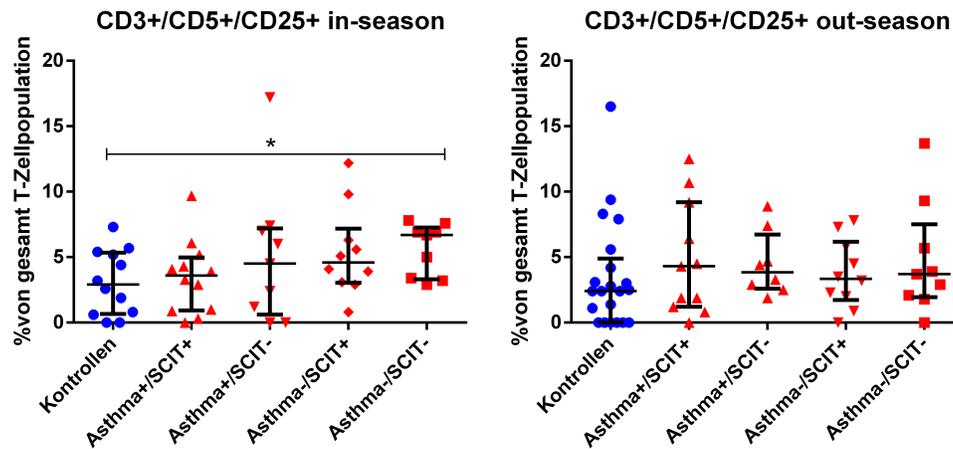


Abbildung 4.13: Vergleich der T- regulatorischen Zellverteilung in den Subgruppen

Während der Pollenbelastung besteht ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test $p < 0.05$) zwischen den Kontrollen (Median: 2,9%) und der Subgruppe Asthma-/SCIT- (Median: 6,7%). Dieser Effekt ist außerhalb nicht zu beobachten.

c) Effektor T-Zellen im Sputum

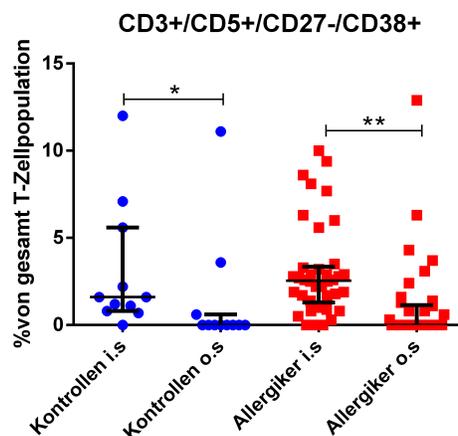


Abbildung 4.14: Relative Effektorzellzahlen in- und out-season

Betrachtet man die Effektor T-Zellen zeigt sich ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.05$, $p < 0.0001$) zwischen in- und out-season, sowohl bei den Kontrollen (Median: i.s.=1,6% o.s.=0,0%) als auch bei den Allergikern (Median: i.s.=2,6%

o.s.=0,0%). Allerdings ist dieser Effekt bei den Allergikern wesentlich deutlicher. Somit ist der prozentuale Anteil an CD3+/CD5+/CD27-/CD38+ Effektorzellen während der Pollenbelastung im Sputum höher.

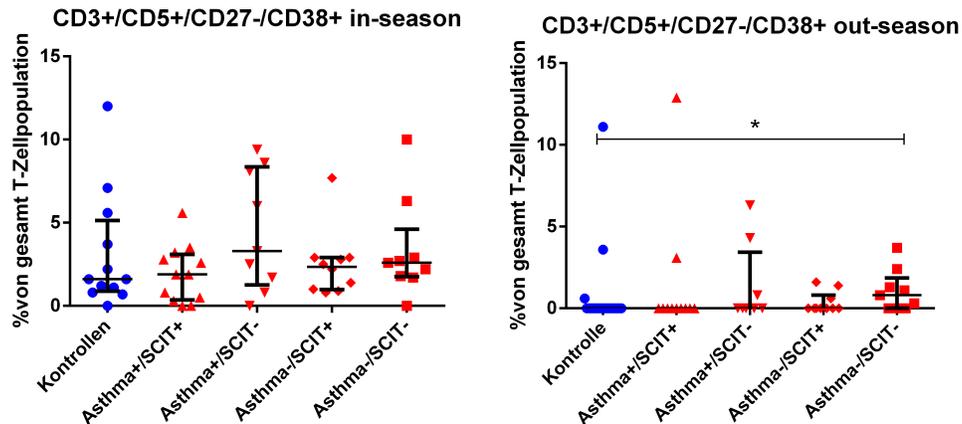


Abbildung 4.15: Vergleich der Effektorzellverteilung in den Subgruppen

In-season fällt die Tendenz auf, dass sich Allergiker mit einer Immuntherapie (Median: Asthma+/ SCIT+=1,9% Asthma-/SCIT+=2,35%) phänotypisch im CD27-/CD38+-Profil den Kontrollen (Median 1,6%) angleichen. Allergiker ohne spezifischer Immuntherapie hingegen zeigen höhere Werte (Median: Asthma+/SCIT-=3,3% Asthma-/SCIT-=2,6%). Konkordant zeigt sich out-season sogar ein statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p = 0.0069$) höherer Anteil an CD27-/CD38+ Zellen in der Asthma-/SCIT- Gruppe (Median 0,8%) als bei den Kontrollen (Median 0,0%). Allergiker mit einer SCIT zeigen die selben Medianwerte (0,0%) wie die Kontrollgruppe (Median 0,0%).

Phänotypisierung von B-Zellsubpopulationen

a) B-Zellen im Sputum

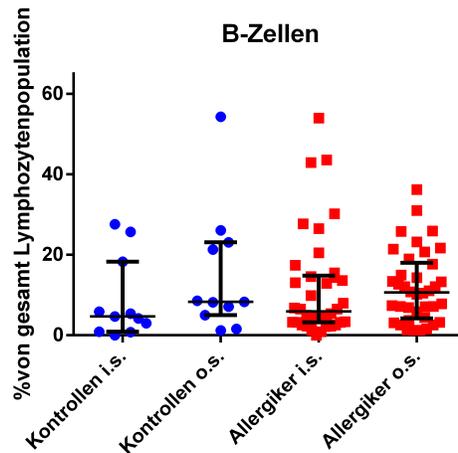


Abbildung 4.16: Relative B-Zellzahl in- und out-season

In dem Diagramm zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p > 0.05$) in- und out-season zwischen Kontrollen (Median: i.s.=4,7% o.s.=8,3%) und Allergikern (Median: i.s.=6,0% o.s.=10,7%).

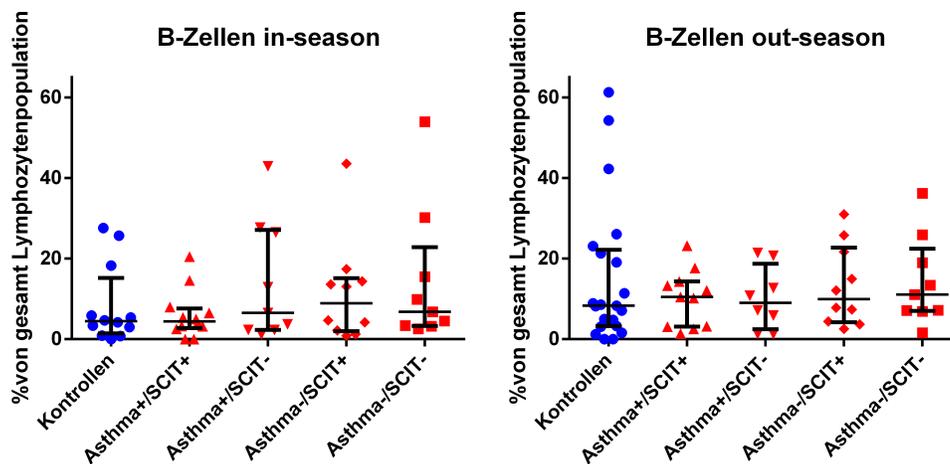


Abbildung 4.17: Vergleich der B-Zellverteilung in den Subgruppen

Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen (Kruskal-Wallis-Test).

b) Memory B-Zellen im Sputum

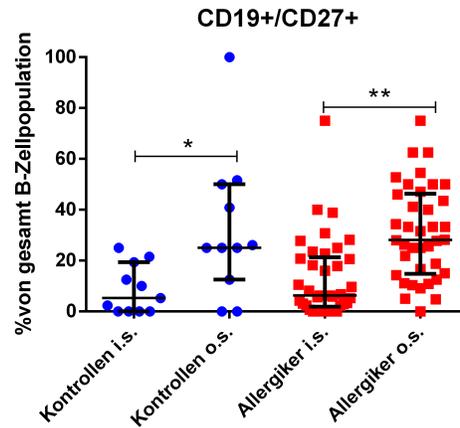


Abbildung 4.18: Relative Memory B-Zellzahl in- und out-season

Betrachtet man die Memory B-Zellpopulation so fällt interessanterweise ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.05$, $p < 0.0001$) zwischen in- und out-season, sowohl bei den Kontrollen (Median: i.s.=5,3% o.s.=25,0%) als auch den Allergikern (Median: i.s.=6,3% o.s.=28,1%), auf. Somit ist der prozentuale Anteil an CD19+/CD27+ Memory B-Zellen während der Pollenbelastung deutlich niedriger.

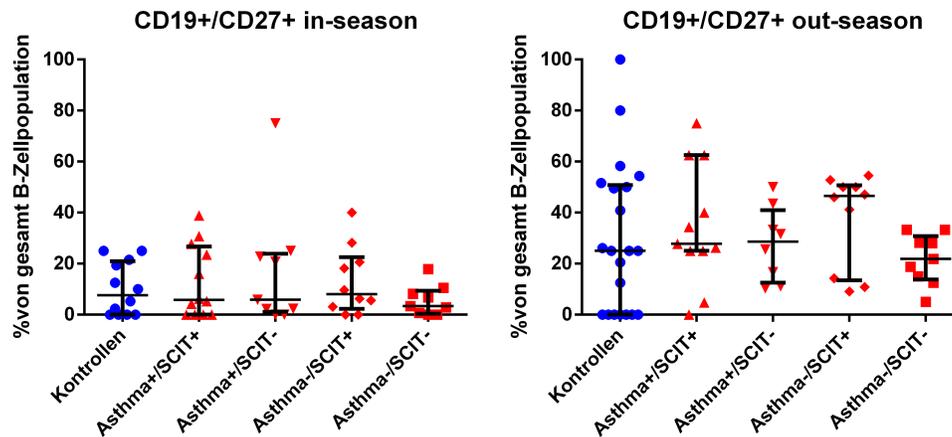


Abbildung 4.19: Vergleich der Memory B-Zellverteilung in den Subgruppen

Hier zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen (Kruskal-Wallis-Test).

c) B1a-Zellen im Sputum

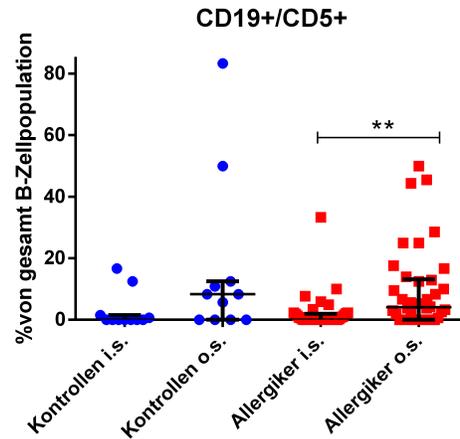


Abbildung 4.20: Relative CD19+/CD5+ B-Zellzahl in- und out-season

Das Diagramm zeigt die CD19+/CD5+ B-Zellpopulation, sogenannte B1a-Zellen. Dieses Expressionsmuster ist mit einem regulatorischen Phänotyp assoziiert. Statistisch zeigt sich ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.0001$) zwischen in- und out-season bei den Allergikern (Median: i.s.=0,0% o.s.=4,05%), bei den Kontrollen (Median: i.s.=0,0% o.s.=8,3%) hingegen nicht.

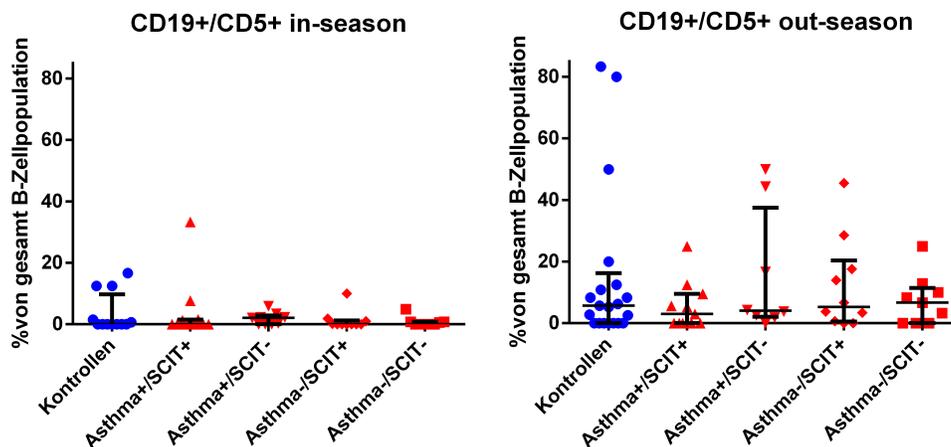


Abbildung 4.21: Vergleich der CD19+/CD5+ B-Zellverteilung in den Subgruppen

In beiden Graphen zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen (Kruskal-Wallis-Test).

d) Plasmazellen im Sputum

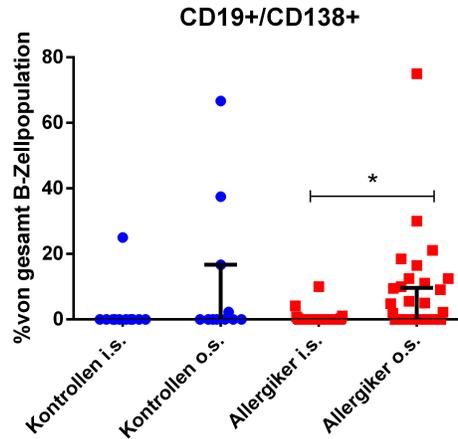


Abbildung 4.22: Relative Plasmazellzahl in- und out-season

Statistisch zeigt sich ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p = 0.0003$) saisonbedingt bei den Allergikern (Median: i.s.=0,0% o.s.=0,0% Mittelwert: i.s.=0,4% o.s.=6,5%), nicht jedoch bei den Kontrollen.

e) mögliche B-regulatorische Zellen im Sputum

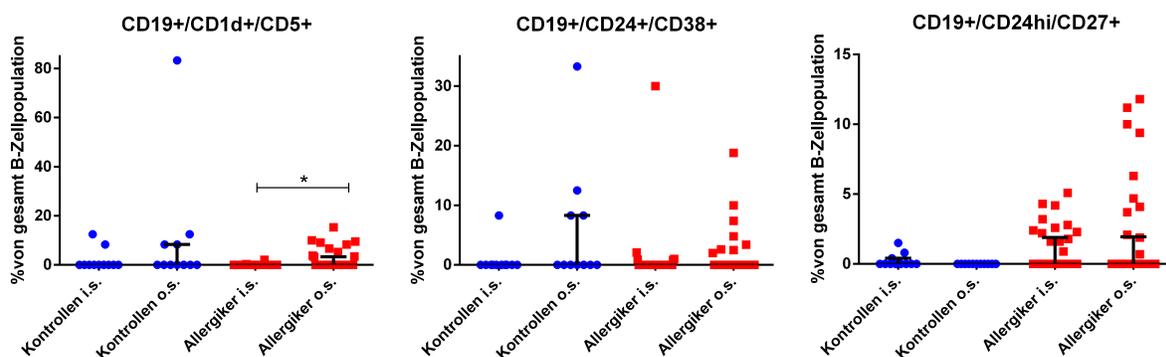


Abbildung 4.23: mögliche B-regulatorische Zellen in- und out-season

Die drei Abbildungen zeigen mögliche B-regulatorische Zellpopulationen im Sputum. Gemäß Literaturrecherche wurde diese Gatingstrategie bislang nur im Mausmodell und auf Blutzellen angewandt. Die vorliegende Arbeit beschreibt einen Versuch diese Zellpopulationen

auch im Sputum darzustellen. Tendenziell scheinen Allergiker einen höheren Anteil an möglichen B-regulatorischen Zellen zu besitzen. Dieser Effekt zeigt sich besonders außerhalb der Pollensaison. Statistisch signifikant wird dieses Ergebnis bei der CD19+/CD1d+/CD5+ Population. Hier zeigt sich im Wilcoxon-Rang-Test zwischen in- und out-season bei Allergikern ein Wert von $p = 0.0024$. In den beiden anderen Abbildungen ist der Wilcoxon-Rang-Test jeweils nicht signifikant $p > 0.05$.

4.3.3 Durchflusszytometrische Phänotypisierung der PBMCs

Phänotypisierung von T-Zellsubpopulationen

a) T-Zellen in den PBMCs

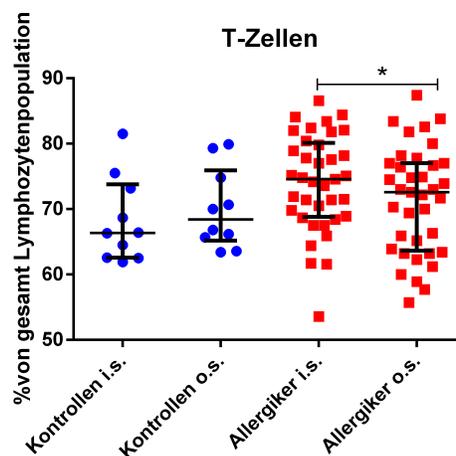


Abbildung 4.24: Relative T-Zellzahlen in- und out-season

Die relative T-Zellzahl unterscheidet sich bei den Allergikern zwischen in- (Median 74,6%) und out-season (Median 72,6%) signifikant (gepaarter t-Test; $p = 0.0079$). Diesen Effekt beobachtet man hingegen nicht bei den Kontrollen (gepaarter t-Test; $p > 0.05$).

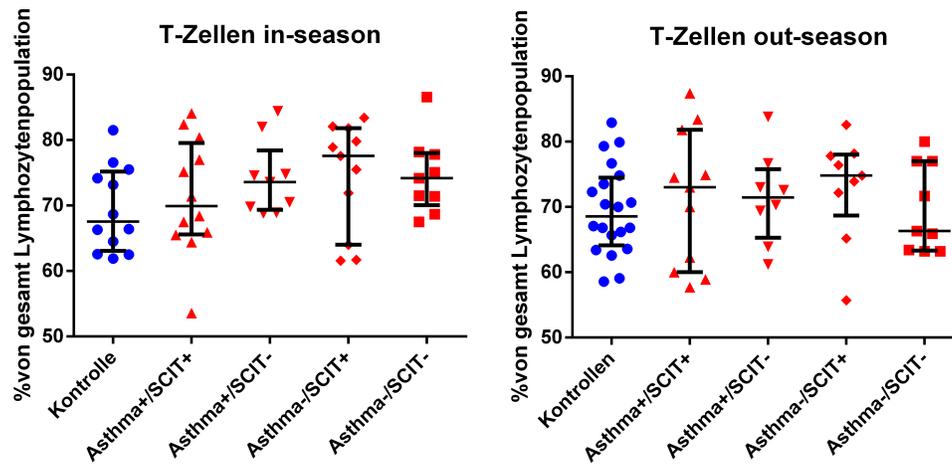


Abbildung 4.25: Vergleich der T-Zellverteilung in den Subgruppen

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subpopulationen (One-way ANOVA $p > 0.05$).

b) mögliche T-regulatorische Zellen in den PBMCs

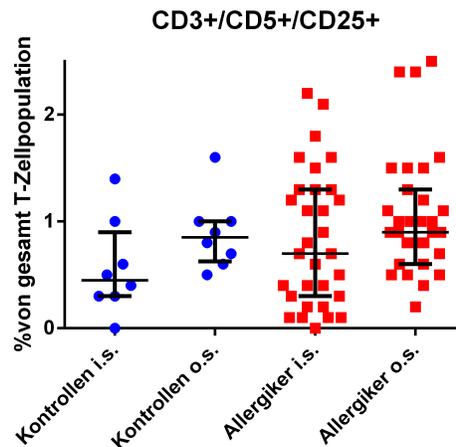


Abbildung 4.26: Relative T-regulatorische Zellzahlen in- und out-season

In der statistischen Auswertung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen in- und out-season in beiden Gruppen (Wilcoxon-Rang-Test $p > 0.05$).

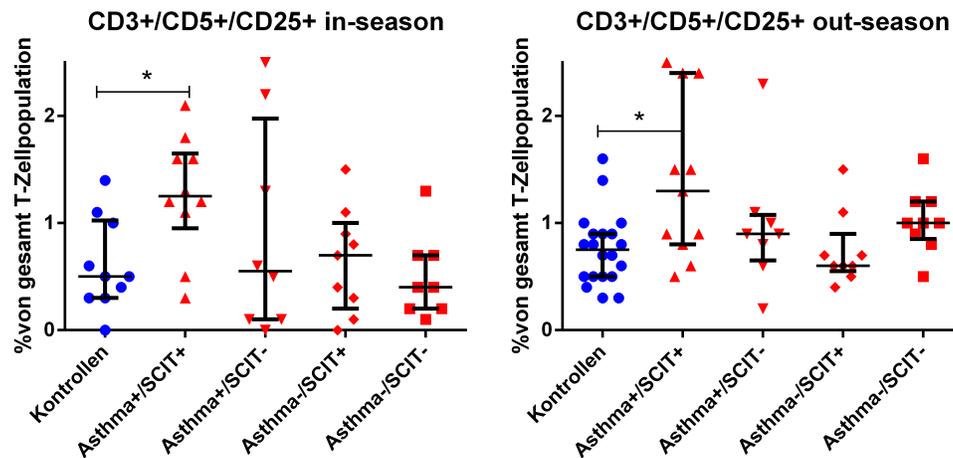


Abbildung 4.27: Vergleich der T-regulatorischen Zellverteilung in den Subgruppen

Mögliche T-regulatorische Zellen befinden sich statistisch signifikant häufiger im Blut in der Subgruppe Asthma+/SCIT+, sowohl während (Mann-Whitney-U-Test $p < 0.05$; Median: Kontrollen 0,5%, Asthma+/SCIT+ 1,25%) als auch außerhalb der Pollenbelastung (Mann-Whitney-U-Test $p < 0.05$; Median: Kontrolle 0,75%, Asthma+/SCIT+ 1,3%).

c) Effektor T-Zellen in den PBMCs

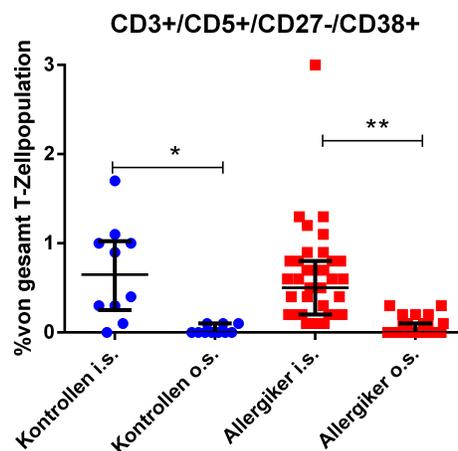


Abbildung 4.28: Relative Effektorzellzahlen in- und out-season

Der prozentuale Anteil an CD3+/CD5+/CD27-/CD38+ Effektorzellen im peripheren Blut ist während der Pollenbelastung signifikant höher (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p <$

0.05, $p < 0.0001$), sowohl bei den Kontrollen (Median: i.s.=0,65% o.s.=0,0%) als auch bei den Allergikern (Median: i.s.=0,5% o.s.=0,0%).

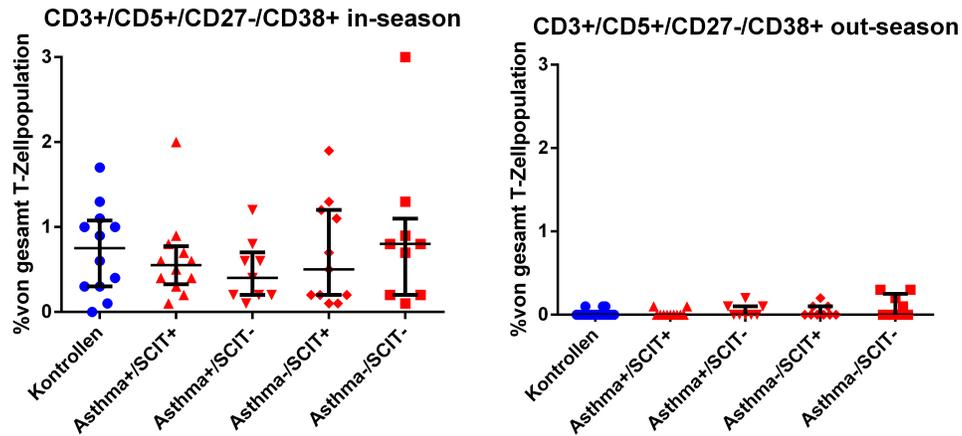


Abbildung 4.29: Vergleich der Effektorzellverteilung in den Subgruppen

In beiden Graphen zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen (Kruskal-Wallis-Test).

Phänotypisierung von B-Zellsubpopulationen

a) B-Zellen in den PBMCs

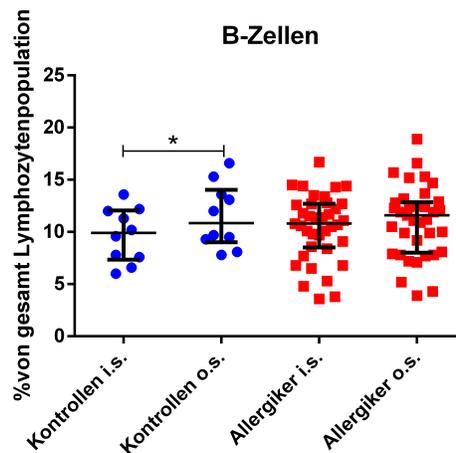


Abbildung 4.30: Relative B-Zellzahl in- und out-season

In der Auswertung zeigt sich ein signifikanter Unterschied (gepaarter T-Test $p < 0.05$) zwischen in- und out-season bei den Kontrollen (Median: i.s.=9,9% o.s.=10,9%). Bei den Allergikern (Median: i.s.=10,8% o.s.=11,6%) zeigt sich dieser Effekt hingegen nicht.

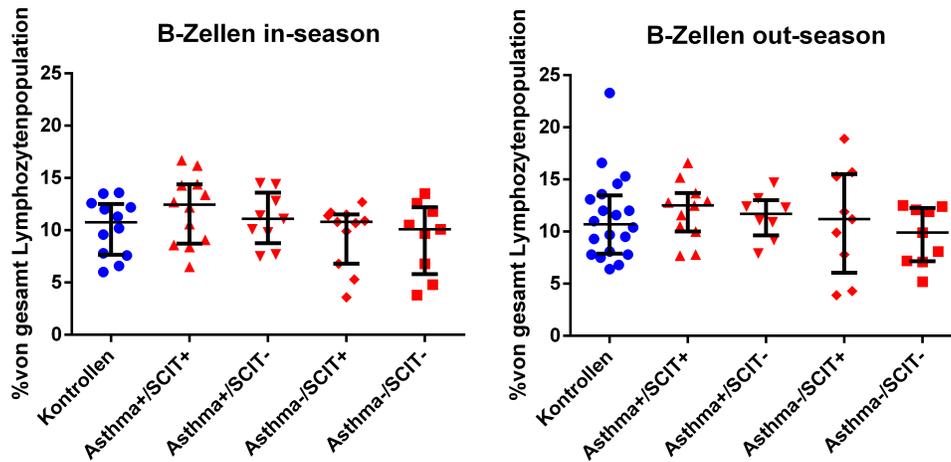


Abbildung 4.31: Vergleich der B-Zellverteilung in den Subgruppen

Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen (One-way ANOVA (in-season) und Kruskal-Wallis-Test (out-season)).

b) Memory B-Zellen in den PBMCs

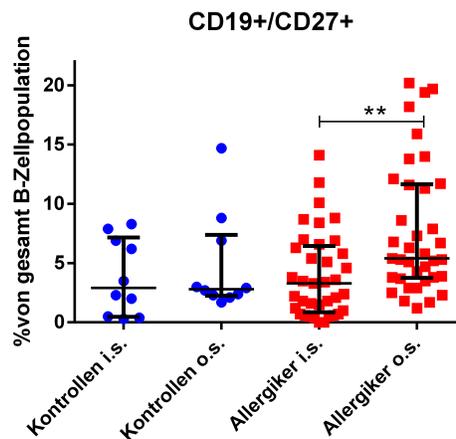


Abbildung 4.32: Relative Memory B-Zellzahl in- und out-season

Betrachtet man die Memory B-Zellpopulation stellt sich ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.0001$) zwischen in- und out-season bei den Allergikern (Median: i.s.=3,3% o.s.=5,4%) dar. Bei den Kontrollen beobachtet man diesen Effekt hingegen nicht (Median: i.s.=2,9% o.s.=2,8%). Somit ist der prozentuale Anteil an CD19+/CD27+ Memory B-Zellen bei Allergikern auch im Blut während der Pollenbelastung niedriger, konkordant zu den Ergebnissen der Sputumauswertung.

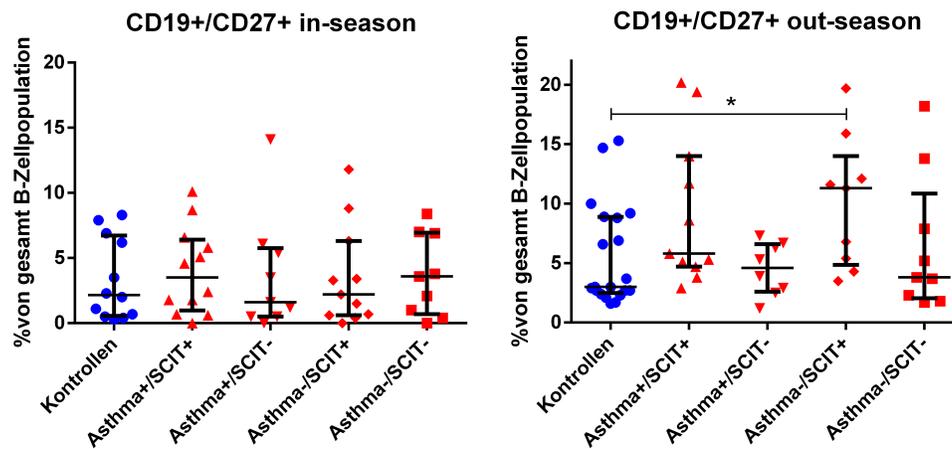


Abbildung 4.33: Vergleich der Memory B-Zellverteilung in den Subgruppen

Während der Pollenbelastung zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den einzelnen Subpopulationen (Kruskal-Wallis-Test). Außerhalb hingegen wird ein signifikanter Effekt zwischen den Kontrollen und der Asthma-/SCIT+ Gruppe (ungepaarter T-Test $p < 0.05$, Median: Kontrollen=3,0% Asthma-/SCIT+=11,3%) sichtbar.

c) B1a-Zellen in den PBMCs

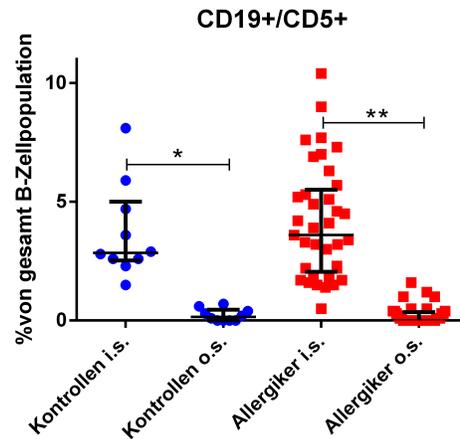


Abbildung 4.34: Relative CD19+/CD5+ B-Zellzahl in- und out-season

Das Diagramm stellt eine CD19+/CD5+ B-Zellsubpopulation, die sogenannten B1a-Zellen, dar. Dieses Expressionsmuster ist mit einem regulatorischen Phänotyp assoziiert. Statistisch zeigt sich ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p = 0.0005$) zwischen in- und out-season bei den Kontrollen (Median: i.s.=2,85% o.s.=0,15%) sowie bei den Allergikern, allerdings bei diesen deutlicher (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.0001$ Median: i.s.=3,6% o.s.=0,0%).

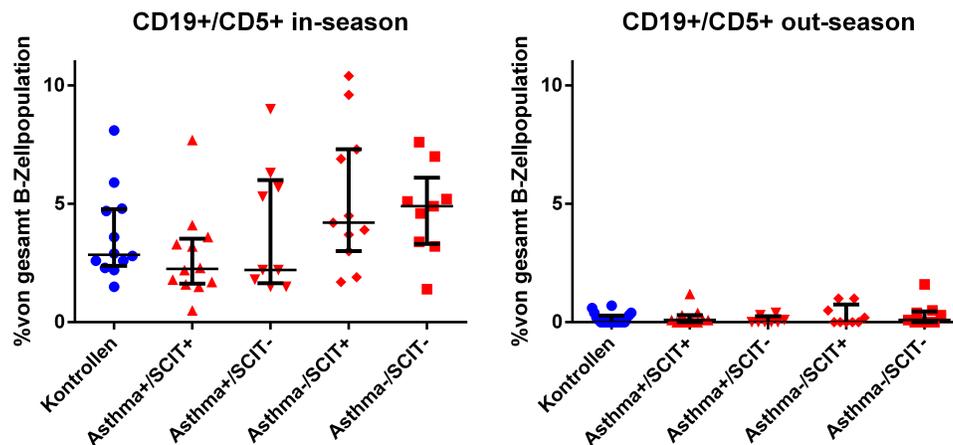


Abbildung 4.35: Vergleich der CD19+/CD5+ B-Zellverteilung in den Subgruppen

Es können keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen (Kruskal-Wallis-Test) festgestellt werden.

d) Plasmazellen in den PBMCs

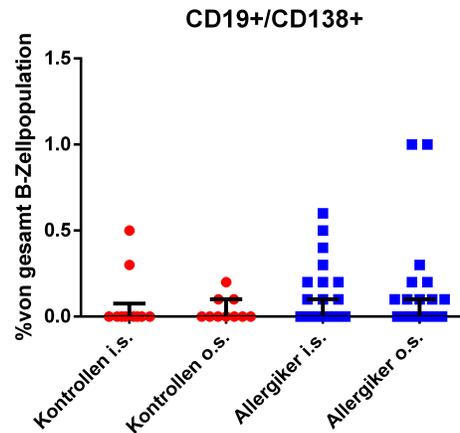


Abbildung 4.36: Relative Plasmazellzahl in- und out-season

Statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p > 0.05$) zwischen in- und out-season, sowohl bei den Allergikern als auch den Kontrollen.

e) mögliche B-regulatorische Zellen in den PBMCs

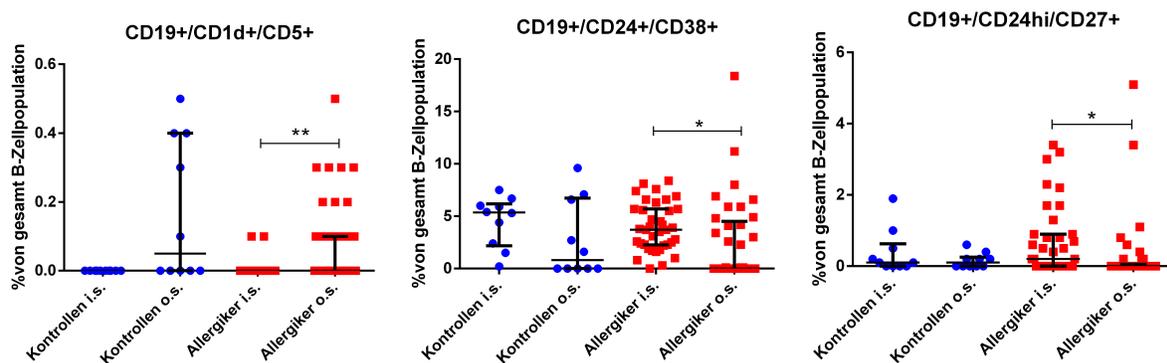


Abbildung 4.37: mögliche B-regulatorische Zellen in- und out-season

Die drei Abbildungen zeigen mögliche B-regulatorische Zellpopulationen im peripheren Blut. Tendenziell scheinen Allergiker einen höheren Anteil an B-regulatorischen Zellen zu

besitzen, wobei sich die Verteilung zwischen in- und out-season in den verschiedenen Populationen nicht gleichsinnig verhält. Statistisch signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.0001$) zeigen sich mehr CD19+/CD1d+/CD5+ Zellen außerhalb der Pollensaison bei den Allergikern. Umgekehrt verhält es sich bei den CD19+/CD24hi/CD38+ (Median; Allergiker i.s.=3,7% o.s=0,0%) und den CD19+/CD24+/CD27+ (Median; Allergiker i.s.=0,2% o.s=0,0%) Zellen. Hier beobachtet man während der Pollenbelastung größere Populationen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.05$).

4.4 Korrelation mit klinischen Daten

Der folgende Abschnitt zeigt den Versuch Zellpopulation, die für die Modulation der allergischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, in Zusammenhang mit klinisch messbaren Reaktionen oder Symptomen zu setzen. Hier steht der explorative Charakter im Vordergrund. Verglichen wurden nur Labordaten die in-season (also während der Pollenbelastung) und bei Allergikern erhoben wurden. Diese wurden in Relation zu Labordaten, gemessen bei den Allergikern während der Allergiesaison, gesetzt. Als klinisch wichtiger Laborparameter wurde das gemessene Gesamt-IgE im Serum gewählt. Zusätzlich wurde der Prick-Test inkludiert, als die direkt sichtbare Hautreaktion des betroffenen Patienten auf das jeweilige Antigen (hier: Gräser- und Birkenpollen). Die Prick-Werte wurden zeitgleich mit der Sputuminduktion erhoben. Die klinischen Parameter konzentrieren sich auf verschiedene Teilaspekte. In ihrer Gesamtheit eignen sie sich gut um allergische Symptome differenzierter zu betrachten.

4.4.1 Korrelation der Ergebnisse mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum

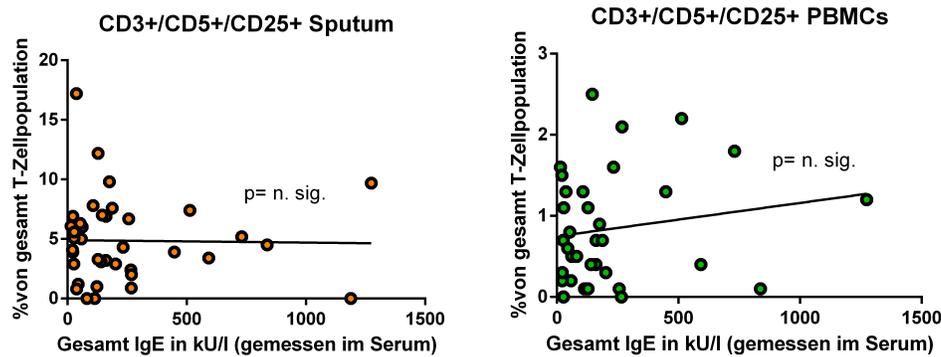


Abbildung 4.38: Korrelation der CD3+/CD5+/CD25+ T-Zellpopulation im Sputum und Blut (gemessen bei Allergikern in-season) mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum

Die beiden Abbildungen verdeutlichen, dass mögliche T-regulatorische Zellen weder im Sputum noch im peripheren Blut in Korrelation mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum stehen (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=-0.020$ (Abb.1) $r=0.095$ (Abb.2); $p > 0.05$).

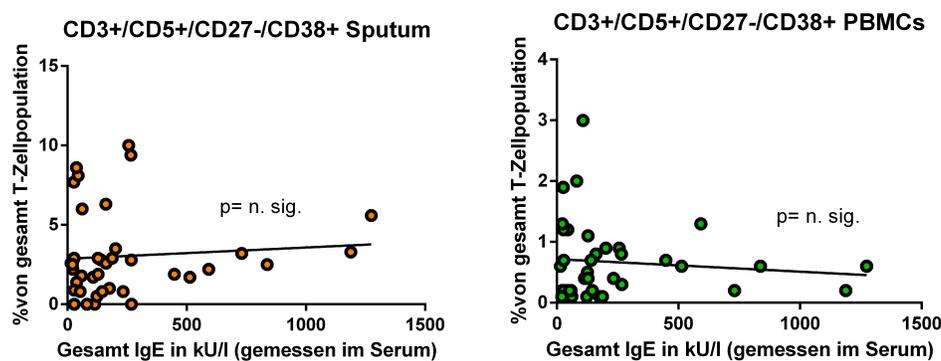


Abbildung 4.39: Korrelation des IgE-Wertes mit CD5+/CD27-/CD38+ T-Zellpopulation im Sputum und Blut (gemessen bei Allergikern in-season) mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Blut

Dasselbe beobachtet man auch bei der Korrelation mit den Effektor T-Zellen (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=0.110$ (Abb.1) $r=0.036$ (Abb.2); $p > 0.05$).

4.4.2 Korrelation der Ergebnisse mit der Hauttestung

Pollen-Antigen

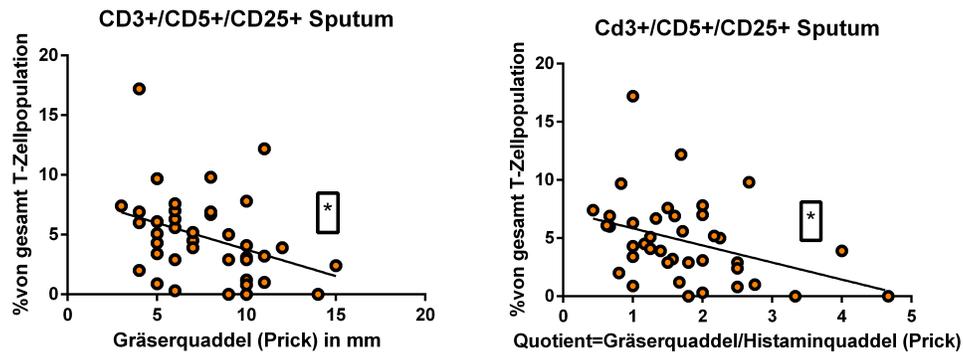


Abbildung 4.40: Korrelation des Pollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T-Zellpopulation im Sputum bei Allergikern in-season

In beiden Graphen zeigt sich eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils an CD5+/CD25+ T-Zellen je größer sich die Hautreaktion beim Prick-Test darstellt (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=-0.384$ (Abb.1) $r=-0.390$ (Abb.2); $p < 0.05$). In der zweiten Graphik wird der Durchmesser der Gräserpollenquaddel in Bezug auf den Durchmesser der Histaminquaddel (hier: Positivkontrolle) referenziert. Dieses Verfahren wurde entwickelt um die spezifische Hautreaktion, ausgelöst durch die verschiedenen Antigenen, zu objektivieren. Der Wert 5 auf dieser Skala bedeutet, dass der Durchmesser der Hautreaktion, ausgelöst durch das Antigen (hier standardisierte Pricktestlösung Gräserpollenantigen), 5 mal größer im Durchmesser ist als die der Positivkontrolle Histamin. Dieses zusätzliche Korrelationsverfahren wurde für alle folgenden Hauttestungen angewandt.

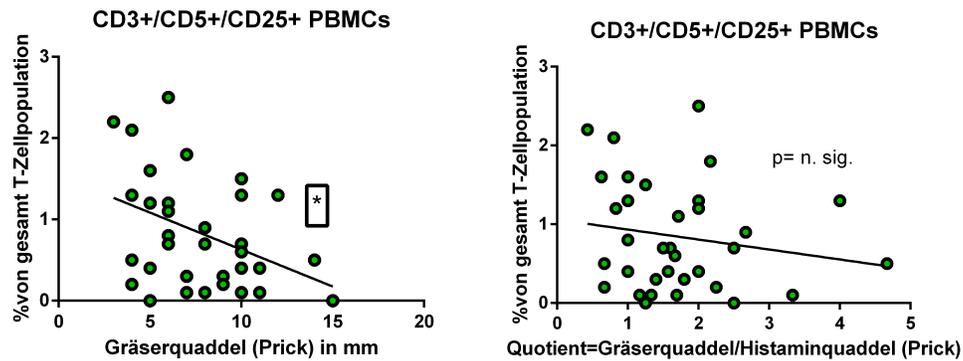


Abbildung 4.41: Korrelation des Gräserpollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T- Zellpopulation im Blut bei Allergikern in-season

Der Effekt, der sich im Sputum darstellt, kann nur auch im peripheren Blut beobachtet werden. Signifikant wird nur die direkte Korrelation der Gräserpollenquaddel mit der Zellhäufigkeit (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=-0.356$ (Abb.1) $p < 0.05$; $r=-0.180$ (Abb.2) $p > 0.05$). Hier nimmt die T-Zellpopulation mit der Größe der Quaddel invers ab, bei dem Quotienten zeigt sich eine gleichsinnige Tendenz.

Birken-Antigen

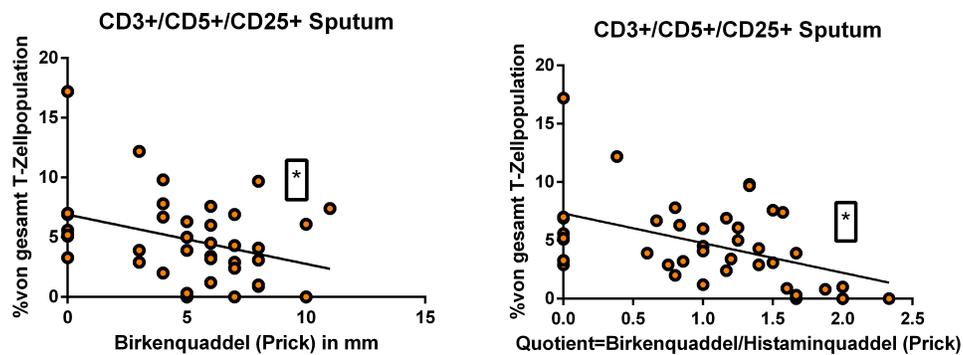


Abbildung 4.42: Korrelation des Birkenpollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T- Zellpopulation im Sputum bei Allergikern in-season

Da während der Datenaufnahme in der Allergiesaison auch eine Birkenpollenbelastung zu verzeichnen war, wurden die Labordaten zusätzlich mit den Ergebnissen der Birkenpollen-Prick-Testung verglichen. Bei beiden Graphen zeigt sich eine signifikante Abnahme des

prozentualen Anteils an CD5+/CD25+ T-Zellen je stärker die Haut reagiert, konkordant zu den Ergebnissen mit dem Gräserpollenantigen (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=-0.330$ (Abb.1) $r=-0.462$ (Abb.2); $p < 0.05$).

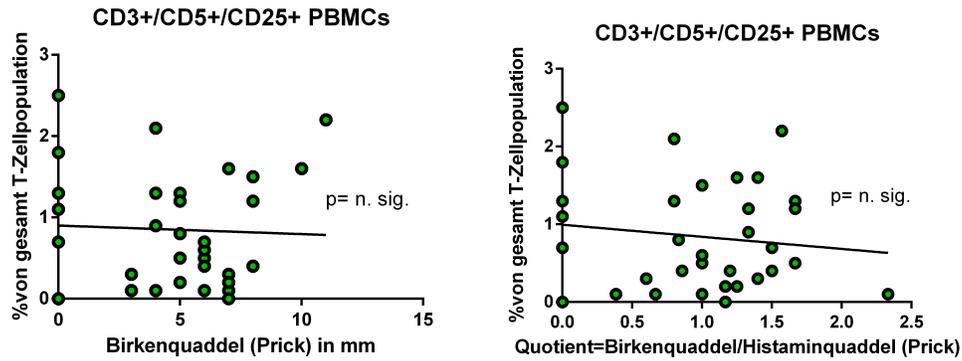


Abbildung 4.43: Korrelation des Birkenpollen-Prickwertes mit der CD5+/CD25+ T- Zellpopulation im Blut bei Allergikern in-season

Die im Sputum erzielten Korrelationen werden hingegen im peripheren Blut nicht beobachtet (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=-0.057$ (Abb.1) $r=-0.044$ (Abb.2); $p > 0.05$).

4.5 Auswertung der Zytospins

Tabelle 4.1: Zellverteilung im Sputum bei Allergikern und Kontrollen

| | Kontrollen i.s. (n=8) | Allergiker i.s. (n=35) | p-Wert | Kontrollen o.s. (n=17) | Allergiker o.s. (n=36) | p-Wert |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------|---------------------------|---------------------------|--------|
| Makrophagen in [%] | 83,30 [67,88-97,13] | 73,35 [10,63-98,13] | n.s. | 76,13 [37,13-96,0] | 70,18 [14,75-96,13] | n.s. |
| Neutrophile in [%] | 15,06 [2,38-26,88] | 23,48 [1,50-84,13] | n.s. | 21,93 [1,5-62,13] | 28,25 [2,88-84,13] | n.s. |
| Lymphozyten in [%] | 1,17 [0,0-4,75] | 1,74 [0,0-6,38] | n.s. | 0,71 [0,0-2,5] | 0,89 [0,13-2,63] | n.s. |
| Eosinophile in [%] | 0,36 [0,0-1,0] | 1,15 [0,0-3,5] | p<0,05 | 0,20 [0,0-0,5] | 0,44 [0,0-1,5] | p<0,05 |
| Basophile in [%] | 0,11 [0,0-0,25] | 0,29 [0,0-2,25] | n.s. | 0,05 [0,0-0,25] | 0,07 [0,0-0,25] | n.s. |

Die mikroskopische Auswertung der Zytospins ergibt folgende (siehe Tabelle 4.1) Zellverteilungen. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte mit Minima und Maxima in eckigen Klammern. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei fällt auf, dass Sputum von Allergikern mehr Lymphozyten und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) aufweist. Statistisch signifikant wird der Unterschied bei den eosinophilen Granulozyten, sowohl während der Pollenbelastung als auch außerhalb sichtbar. Das Ergebnis ist somit konkordant mit wissenschaftlichen Studien, die Allergien als persistierende Entzündungen beschreiben, die unter anderem von eosinophilen Granulozyten moduliert werden.

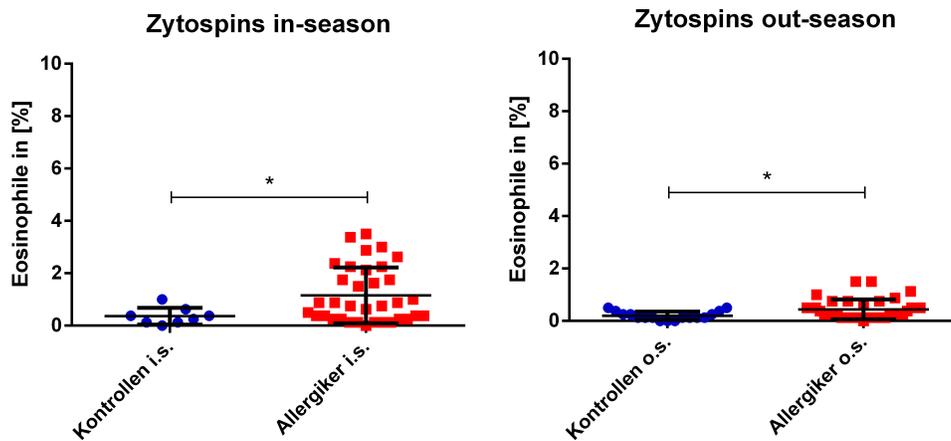


Abbildung 4.44: Vergleich des prozentualen Anteils an Eosinophilen im Sputum bei Allergikern und Kontrollen in- und out-season

Bei Allergikern lassen sich jahreszeitlich unabhängig statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p < 0.05$) prozentual mehr eosinophile Granulozyten nachweisen als bei den gesunden Probanden.

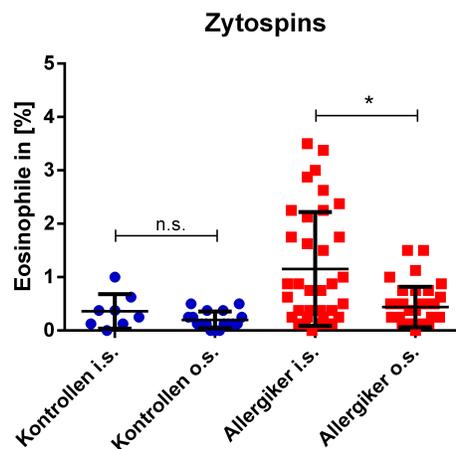


Abbildung 4.45: Vergleich des prozentualen Anteils an Eosinophilen zwischen in- und out-season innerhalb den Kontrollen und den Allergikern

Vergleicht man die Werte vor und nach Pollenbelastung bei den Kontrollen und Allergikern so fällt auf, dass Allergiker während der Pollenbelastung signifikant mehr eosinophile Granulozyten im Sputum aufweisen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0.05$).

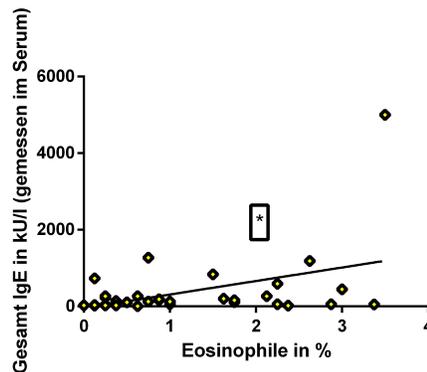


Abbildung 4.46: Korrelation des prozentualen Anteils an Eosinophilen im Sputum aller Probanden in-season mit dem IgE-Gesamtspiegel gemessen im Serum

Bei der Korrelation des prozentualen Anteils an eosinophilen Granulozyten im Sputum mit dem IgE-Gesamtspiegel gemessen im Serum während der Allergiesaison stellt sich ein signifikanter Zusammenhang (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=0,410$ $p < 0.05$) dar. Bei Allergien vom Soforttyp (Typ I) kommt es TH2-zellvermittelt zu einer massiven IgE Produktion durch die B-Zellen und nachfolgend insbesondere zur Ansammlung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Diese sind maßgeblich an der anhaltenden entzündlichen Reaktion beteiligt. Auch mit den Sputumdaten lassen sich diese Zusammenhänge darstellen und unterstreichen die hohe Qualität und das wissenschaftliche Interesse dieses Mediums.

Kapitel 5

Diskussion

Die vorliegende Arbeit begründet sich in ihrer Durchführung und Methodik in weiten Teilen auf Arbeiten von Dr. Zissler. Seine 2012 veröffentlichte Doktorarbeit zur Analyse von Biomarkern im induzierten Sputum bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen beschäftigt sich ausführlich mit der Ausarbeitung einer standardisierten Methode der Sputuminduktion, sowie der Sputumaufbereitung (Zißler, 2012). Durch die Einhaltung des damals entwickelten Protokolls wurde es möglich, Sputum in sehr hoher Qualität zu generieren, Ausgangspunkt für alle folgenden Untersuchungen in dieser Doktorarbeit.

5.1 Klinische Daten

Bezüglich der Sputumprozessierung zeigt sich, dass der Anteil an Plattenepithelzellen nur bei der Kontrollgruppe während der Pollenbelastung leicht über dem Grenzwert von 15% liegt. Dies stellt ein Qualitätsmerkmal für Sputum dar, etabliert in der Doktorarbeit von Dr. Zissler (Zißler, 2012). Sowohl bei den Allergikern in-season als auch bei beiden Gruppen out-season, konnte der Grenzwert eingehalten werden. Dies führt zur der Annahme, dass Allergikersputum sich zu einem höheren Anteil aus Abwehrzellen zusammensetzt. Gleichzeitig bemerkt man auch eine Qualitätsverbesserung zwischen in- und out-season. Dies ist sicherlich auf eine Lernkurve bei der Umsetzung der SOPs (Zißler, 2012) zurückzuführen. Bezogen auf die Gesamtzellzahl der Patientenproben konnten Werte von 75% vitaler Zellen erbracht werden. Betrachtet man den Anteil an lebenden Leukozyten an den Gesamtleukozyten erreicht man Werte über 85% (Mittel: 88.9%). Obwohl sich das Lebend-Verhältnis der einzelnen Zellgruppen im Sputum zwischen Kontrollen und Allergikern kaum unterscheidet, stellt man fest, dass die Gesamtleukozytenzahl im Allergikersputum im Durchschnitt

das Doppelte ($4,38 \times 10^6$ versus $2,08 \times 10^6$) beträgt. Somit ergibt sich ein deutlicher Hinweis, dass in der Lunge verstärkt Entzündungsreaktionen stattfinden, bei denen Immunzellen eine tragende Rolle spielen.

Die Ergebnisse des Tiffeneau-Wertes zeigen, wie in der Literatur vorbeschrieben, den deutlichen Abfall der relativen Einsekundenkapazität bei Patienten mit Asthma. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Voraussetzung, dass jene ausgewählten Asthmapatienten tatsächlich an einem bronchialem Asthma mit Lungenfunktionseinschränkung leiden. Mit Hilfe des RQLQ-Wertes zeigt sich, dass die Patienten von einer saisonalen Allergie betroffen sind, da deutliche Symptomverbesserungen außerhalb der Pollenbelastung angegeben werden.

5.2 Durchflusszytometriedaten

Nach Aufnahme von 100.000 Events können im Durchschnitt im Sputum 18.182 Zellen als lebend gewertet werden, bei den PBMCs hingegen nur 16.731. Dieses Ergebnis untermauert die hohe Qualität des Aufreinigungsprozesses und die zügige Verarbeitung. Allerdings zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei den Lymphozytenzahlen. Im Sputum erreicht man Durchschnittswerte absolut um 518 Zellen (SED=46,43) (5,5% an den Lebenden) bei den PBMCs hingegen 7.948 Zellen (SED=406,6) (56,8% an den Lebenden), somit das über 15-fache. Ein Grund hierfür könnte sein, dass im Sputum noch reichlich andere Zellpopulationen wie Alveolarmakrophagen (Zißler, 2012) und Plattenepithelzellen, die ebenfalls leben, gefunden werden und somit den Durchschnittswert der Lymphozyten proportional sinken lassen.

Die PBMCs hingegen setzen sich stringent nur aus Leukozyten zusammen, da andere lebende Blutzellen, durch das Verfahren der Zentrifugation im Vacutainer CPT™, bereits eliminiert wurden. Innerhalb der Leukozyten sterben neutrophile Granulozyten am schnellsten, dadurch steigt der prozentuale Anteil an Lymphozyten innerhalb der Leukozyten überproportional an. Normalerweise beträgt der Lymphozytenanteil um die 40% von der Leukozytenkonzentration (Speckmann et al., 2008). In diesen Experimenten erreicht man Durchschnittswerte um die 56%. Das Ergebnis verdeutlicht das frühe anteilige Absterben neutrophiler Granulozyte. Dadurch steigt die Lymphozytenkonzentration an den Überlebenden überdurchschnittlich stark an. Anhand dieser physiologischen Fakten und Prozesse lässt sich für Folgestudien ableiten, dass die aufgenommene Eventzahl bei Sputum mindestens um das 10-fache höher sein sollte als bei den PBMCs, um absolute Zellzahlen in den

Lymphozytensubpopulationen zu untersuchen.

Schlussfolgernd führte man alle statistischen Auswertungen auf die relativen Zellzahlen bezogen durch, da diese in den Subpopulationen der Lymphozyten vergleichbar waren; T-Zellen (Sputum 46,5% PBMCs 67,1%) und B-Zellen (Sputum 11,9% und PBMCs 10,3%). Die gemessenen Prozentwerte der PBMCs stimmen mit anerkannten Reverenzwerten überein, sodass dies eine valide externe Qualitätskontrolle für Färbung und Gatingstrategie darstellt. In der Literatur wird die prozentuale Verteilung der Lymphozytenpopulation im Blut wie folgt angegeben: T-Zellen (ca.75% hier: 67,1%), B-Zellen (ca.15% hier: 10,3%) und Natürliche Killerzellen (ca. 10% hier nicht bestimmt) (Speckmann et al., 2008). Für die Sputumzellpopulationen findet man noch keine allgemeingültigen Richtwerte. Da diese in der Größenordnung vergleichbar sind mit jenen des Blutes, kann auch hier von einer erfolgreichen Färbung und Gatingstrategie ausgegangen werden.

5.2.1 T-Zellsubpopulationen

In der folgenden Diskussion wird der Fokus bei den T-Zellen auf den beiden bedeutenden CD25 positiven und CD27-/CD38+ Subpopulationen liegen.

CD25+ T-Zellen

Bei der Auswahl der verwendeten Oberflächenmarkern stand zunächst im Vordergrund, einen Großteil möglicher Lymphozytensubpopulationen durch eine heterogene Mischung dieser, zu detektieren. Die Arbeit verschafft einen Überblick, inwieweit verschiedene T- und B-Zellpopulationen im Sputum sowie in den PBMCs dargestellt werden können. Da aufgrund von technischen Gegebenheiten sich die Anzahl der verwendenden Antikörper auf 13 beschränkte, konnte nicht jede Subpopulation exakt charakterisiert werden. Die Intention bestand vielmehr nach potenziellen Subpopulationen zu fahnden, die sich in weiteren Studien präziser bestätigen lassen könnten. Um mögliche T-regulatorischen Zellen zu detektieren, wurde CD25 als anerkannter Marker auf T-regulatorischen Zellen verwendet. Die Oberflächenmarker CD27 und CD38 charakterisieren Effektorzellen näher.

T-regulatorischen Zellen gelten als eine der Hauptakteure bei der Regulation von Immunantworten und Selbsttoleranz (Santegoets et al., 2015). Zahlreiche Veröffentlichungen sehen einen direkten Zusammenhang mit der Anzahl oder Funktionalität von T-regulatorischen Zellen bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie zum Beispiel bei Tumo-

ren, Autoimmundefekten, chronischen Leiden und Entzündungen (Grant, Liberal, Mieli-Vergani, Vergani & Longhi, 2015) (Smigiel, Srivastava, Stolley & Campbell, 2014). In den 70er Jahren wurden Suppressor T-Zellen zum ersten Mal beschrieben (Janeway, Sharrow & Simpson, 1975), in 90er Jahren bestätigte sich, dass CD4+/CD25+ T-Zellen in der Lage sind Entzündungsreaktionen zu regulieren (Sakaguchi, Sakaguchi, Masanao, Misako & Masaaki, 1995) (Pearce, Dorsch & Hall, 1990). Später erkannte man die entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktors FOXP3 für die immunsuppressive Wirkung (Khattari, Cox, Yasayko & Ramsdell, 2003). In den folgenden Jahren avancierten T-regulatorische Zellen zu einem extensiv beforschten Themengebiet. Die Problematik, die sich ergab, lag in der Heterogenität der verschiedenen Definitionen und der Abwesenheit eines standardisierten Testes für die Funktionalität dieser Zellpopulation (Santegoets et al., 2015). Im Oktober 2013 organisierte das CIMT-immunguiding program einen Workshop mit 40 angesehen Experten, um eine Vereinheitlichung bzw. Übereinstimmung der verschiedenen Oberflächenmarker für T-regulatorische Zellen (Tregs) voranzutreiben. Ihre Arbeit wurde 2015 in der Cancer Immunology veröffentlicht (Santegoets et al., 2015). Dabei kamen die Forscher zu der Annahme, dass humane Tregs mindestens durch folgende Marker: CD3, CD4, CD25, CD127 und FOXP3 charakterisiert werden sollten. Ki67, CD45RA und auch FOXP3 (Bailey-Bucktrout & Bluestone, 2011) liefern zusätzliche Informationen über den Aktivierungszustand. Dabei beriefen sich die Forscher auf die drei bis dato gängigsten Treg Definitionen (Sugiyama et al., 2013) (Liu et al., 2006) (Seddiki, 2006) (Miyara et al., 2009) (Golding, Hasni, Illei & Shevach, 2013):

1. CD25 pos/CD127 low/FOXP3 pos
2. FOXP3 pos/Helios pos
3. FOXP3 hi/CD45RA neg und FOXP3 int/CD45RA pos

Zusammenfassend wird die Komplexität dieser Zellpopulation deutlich, da sie sich ihrerseits wieder aus verschiedenen Subpopulationen zusammensetzen. Wie in der Einleitung schon erläutert, spielen T-regulatorische Zellen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen und könnten neue Therapieansätze darstellen (Zhang et al., 2014). Ein weiterer therapeutischer Ansatz wäre auch der Transfer von Antigen-spezifischen T regulatorischen Zellen, ein Versuch der bis jetzt nur im Mausmodell durchgeführt wurde (Xystrakis et al., 2007) (Kearley, Barker, Robinson & Lloyd, 2005). Überraschenderweise zeigte die Studie, dass die Transferbehandlung zu einer Verbesserung der Immunantwort und Hyperreagibilität bei allergisch bedingten Atemwegserkrankungen führte. Lewkowich et al. erkannten

auch die tragende Rolle die Tregs bei allergischem Asthma spielen, da das Fehlen regulatorischer Prozesse zu einer erhöhten Anfälligkeit führen kann (Lewkowich et al., 2005).

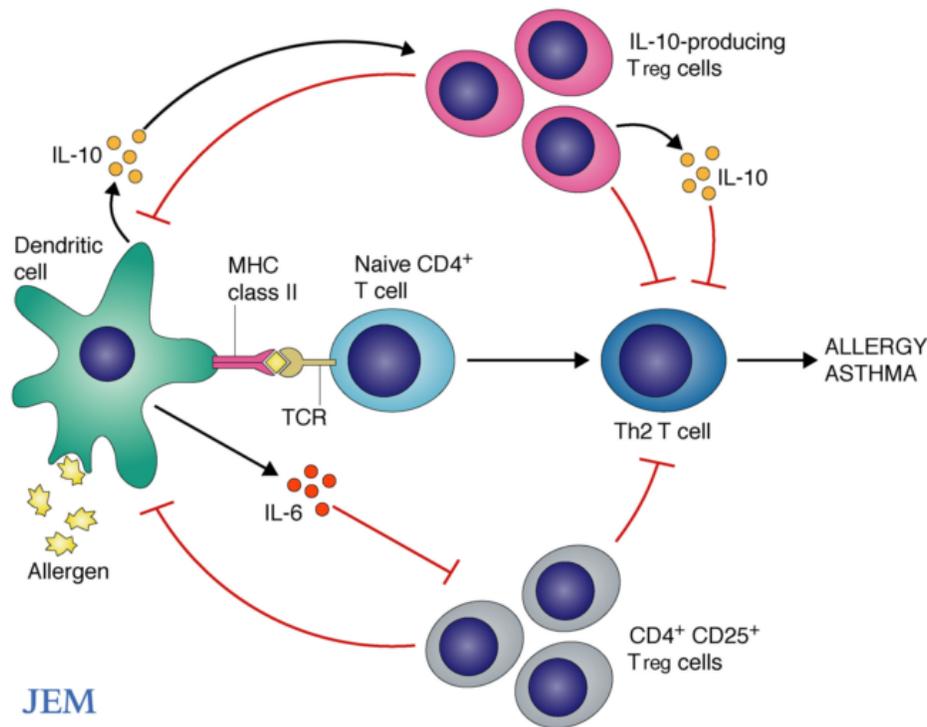


Abbildung 5.1: Kontrollmechanismus T-regulatorischer Zellen bei allergischer Antwort (Quelle: (Hawrylowicz, 2005))

Die Abbildung demonstriert die Wertigkeit T-regulatorischer Zellen in allergischen Reaktionen. Allergische Atemwegserkrankungen werden durch eine überschießende TH2 Immunzellantwort gegen "harmlose" Antigene oder Allergene in der Umwelt ausgelöst. CD4⁺/CD25⁺ und IL-10 produzierende Tregs können in vivo die allergische Sensibilisierung durch inhibitorische Effekte auf TH2 oder dendritische Zellen in der Lunge regulieren. Tregs können zudem weitere T-Zellen in der Lunge zur Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 anregen (hier nicht gezeigt). Im Gegenzug können dendritische Zellen immunmodulatorische Zytokine wie IL-6 produzieren, die inhibitorische Effekte auf die Funktion von CD4⁺/CD25⁺ T-regulatorischen Zellen erzielen. Zudem können sie IL-10 sezernieren, welches wiederum IL-10 produzierende Tregs induziert (Hawrylowicz, 2005).

Für die Umsetzung der Forschungsergebnisse in neue Therapieansätze bei Patienten mit Allergien bedarf es noch viel Forschungsarbeit auf diesem Gebiet. Die folgende Arbeit demonstriert die Möglichkeit, T-regulatorische Zellen im Sputum und im Blut zu detektieren. Die Daten zeigen, dass CD25+ T-Zellen in ausreichender Qualität und Quantität aus dem Sputum generieren werden können. Ziel weiterer Studien könnte sein, die oben genannten Oberflächenmarker in ein neues Durchflusszytometrie-Panel zu integrieren, um präzisere Aussage über vorhandene T-regulatorische Zellen zu treffen und eine noch genauere Charakterisierung zu ermöglichen. Allerdings lässt sich aus den hier gewonnenen Daten einen Tendenz ableiten, dass Allergiker eine größere Population an CD25+ Zellen besitzen. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse auch, dass der Anteil an CD25+ Zellen an den Gesamt-T-Zellen im Sputum fast fünfmal höher ist als im peripheren Blut (Durchschnittswert Allergiker in-season; Sputum: 4,79% PBMCs: 0,84%).

Diese Erkenntnis unterstreicht die Wertigkeit, Sputum als ein probates Medium für Entzündungsreaktionen in der Lunge in Forschungsarbeiten miteinzubeziehen. Außerdem zeigen sich im peripheren Blut signifikant mehr CD25+ Zellen bei Patienten mit Asthma und einer Immuntherapie (SCIT). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den oben beschriebenen Publikationen (Lewkowich et al., 2005) (Hawrylowicz, 2005), die die enorme Wichtigkeit T-regulatorischer Zellen bei Asthmaerkrankungen erkannten.

CD27-/CD38+ T-Zellen

Entdifferenzierte, allergenspezifische TH2-Effektorzellen wurden in mehreren Publikationen charakterisiert durch das Fehlen des Oberflächenmarkers CD27 (sprich CD27-) auf der Zelloberfläche (Wambre et al., 2012). Die Studie von Wambre et al. konnte aufzeigen, dass der Differenzierungsstatus eine entscheidende Rolle bei der Entscheidung spielt, ob allergenspezifische T-Zellen eine pathologische Relevanz besitzen oder nicht. Somit könnte die Elimination dieser entdifferenzierten CD27 negativen TH2-Zellen entscheidend für die Entwicklung einer spezifischen Immuntoleranz sein. Gezeigt wurde dieser Effekt an einer Patientenkohorte, die eine Immuntherapie erfolgreich abgeschlossen hatte und deren CD27 negative T-Zellspiegel sich signifikant verringert hatte. Die Studie verglich ex vivo allergenspezifische CD4+ T-Zellen von Erlenpollen-toleranten Probanden mit jenen, die an einer Erlenpollenallergie litten, sowie Patienten die eine Immuntherapie erfolgreich absolviert hatten. Der Autor konnte zeigen, dass die CD4+ T-Zellen spezifisch für das Majorgen *Aln g 1*, sowohl in der Patientenkohorte als auch bei der Kontrollgruppe vorzufinden waren, allerdings in unterschiedlicher Häufigkeit. T-Zellen der Kontrollgruppe exprimierten CD27

auf ihrer Oberfläche, waren somit CD27 positiv und würden somit phänotypisch eher zu einer Art Memory-Zelle gezählt werden. Im Gegensatz dazu fanden die Forscher heraus, dass die Aln g1 -spezifischen CD4+ T-Zellen der Allergiker sich in zwei Subgruppen aufteilten. Eine kleine Gruppe exprimierte noch CD27 auf ihrer Oberfläche, die viel größere Gruppe hingegen war CD27 negativ und wurde somit zu den entdifferenzierten Effektorzellen gezählt.

Interessanterweise konnte die Forschergruppe außerdem zeigen, dass sich die CD27-/Aln g 1 spezifische TH2-Zellpopulation bei abgeschlossener Immuntherapie rückläufig zeigte. Allerdings traten nun vermehrt TH1 CD27 positive T-Zellen auf. Diese Veröffentlichung und die Arbeit von H. Maecker "Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project" (Maecker et al., 2012) führten dazu, dass in der vorliegenden Arbeit die Verteilung von CD3+/CD5+/CD27-/CD38+ T-Zellen untersucht wurde. Zusammenfassend kann man diesen Zellphänotyp als entdifferenzierte, aktivierte Effektorzelle bezeichnen.

Interessanterweise gibt es mehrere signifikante Beobachtungen, zum einen ist der Prozentsatz dieses Zellsubtypes während der Pollensaison, sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Allergikern deutlich größer als außerhalb. Dieser Effekt zeigt sich besonders bei den Allergikern mit $p < 0,0001$ (Kontrollen $p < 0,05$). Zum anderen sieht man, dass im Median 1,6% der T-Zellen in der Kontrollgruppe während der Allergiesaison dieser Subpopulation angehören, bei den Allergikern hingegen 2,6%. Das bedeutet, dass Allergikersputum in unsere Studie 60% mehr dieses Zellsubtypes aufweist als das Kontrollsputum. Dieses Ergebnis steht in Konkordanz mit dem von Wambre et al. oben erläuterten Resultat.

Betrachtet man nun die einzelnen Subgruppen, sowohl in- als auch out-season, zeichnet sich die Tendenz ab, dass Allergiker, die keine Immuntherapie (SCIT) erhalten hatten, höhere Werte an CD27-/CD38+ T-Zellen besitzen. Im Umkehrschluss bekräftigt dies die Theorie von Wambre et al., dass eine erfolgreiche Immuntherapie zu einem Rückgang an CD27-T-Zellen führen kann. Natürlich muss an dieser Stelle hinzugefügt werden, dass dieses Ergebnis nicht signifikant ist. Ein Grund könnte die zu klein gewählte Gruppengröße in den einzelnen Subkohorten sein, sodass letzten Endes nur eine Tendenz beschrieben werden kann.

Zusammenfassend ist die Erkenntnis richtungsweisend, da dieser Effekt hier erstmalig im Sputum gezeigt wird. Vorhergehende Arbeiten beschäftigten sich ausschließlich mit Blutzellen. Interessanterweise zeigt sich zusätzlich derselbe Effekt wie auch schon bei den CD25 positiven T-Zellen, dass man im Sputum einen deutlich höheren Prozentsatz an CD27-/CD38+ T-Zellen detektiert als im peripheren Blut (Durchschnitt Allergiker in-season:

Sputum=3.12% PBMC=0,6%). Somit werden im Sputum über 5-fach höhere Werte erreicht als im Blut. Ein weiterer Hinweis weshalb der Sputumuntersuchung, sowohl klinisch als auch in der Forschung, mehr Beachtung zuteil werden sollte.

5.2.2 B-Zellsubpopulationen

Neben verschiedenen Reife- und Endstadien von B-Zellen gibt es drei unterschiedliche Typen, die B2-Zellen, die B1-Zellen, sowie die Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen). B2-Zellen reifen im Knochenmark aus Progenitorzellen und stellen den größten Anteil dar. B1-Zellen machen bei Mensch und Maus etwa 5% aller B-Zellen aus und sind vor allem in den Peritoneal- und Pleuralräumen zu finden. Sie werden schon in der Fetalperiode von der Leber (im Mausmodell) gebildet und reagieren im Gegensatz zu den B2-Zellen des Erwachsenen auf ein breites Spektrum von Antigenen, allerdings mit einer geringeren Affinität. Vermutlich waren sie schon früh in der Evolution vorhanden, um an allgemeine Oberflächenstrukturen von Bakterien zu binden. B2-Zellen produzieren hingegen fein abgestimmte Antikörper durch Isotypenwechsel und Affinitätsreifung aufgrund von somatischer Hypermutation während ihrer Differenzierung (Murphy et al., 2009) (vgl. S.387-389). In dem folgenden Abschnitt werden Memory-B-Zellen, B1a-Zellen und mögliche regulatorische B-Zellen genauer untersucht.

Memory B-Zellen

Memory B-Zellen sind wie T-Gedächtniszellen Teil des immunologischen Gedächtnisses, das sich im Laufe der primären Immunantwort entwickelte und bei einem erneuten Auftreten des selben Pathogens antigenspezifische Antikörper produziert und T-Effektorzellen aktiviert (Murphy et al., 2009) (vgl. S.14). Im Vergleich mit der primären Antikörperantwort werden pathogen-erfahrene Memory B-Zellen schneller und in größerem Ausmaß reaktiv, zudem sind die Antikörper durch Isotypenwechsel höher affin. Die Eigenschaften von Memory B-Zellen zu erforschen und zu charakterisieren ist von fundamentalem Interesse, um das humorale Gedächtnis besser zu verstehen.

Zwei Typen von Memory B-Zellen sind bekannt, die T-Zell-abhängigen und die T-Zell-unabhängigen Memory B-Zellen. Die T-Zell-abhängigen Memory B-Zellen unterteilen sich hingegen in drei Subtypen: durch Antigene aktivierte proliferierende B-Zellen differenzieren sich entweder zu extrafollikulär kurzlebenden Plasmazellen oder zu Keimzentrum abhängigen/unabhängigen Memory B-Zellen. In dieser Pre-Keimzentrums-Periode finden

Isotypenwechsel z.B. zu IgG statt, allerdings kommt es zu keinen somatischen Hypermutationen (Kurosaki, Kometani & Ise, 2015).

Neuere Studien zeigten, dass es auch T-Zell unabhängige Memory B-Zellen gibt (Obukhanych & Nussenzweig, 2006). Lange Zeit wurde angenommen, dass nur konventionelle B2 Zellen als Antwort auf Proteinantigene Memory B-Zellen bilden. Doch konnte gezeigt werden, dass auch B1-Zellen Memory B-Zellen generieren. B1 Zellen werden phänotypisch durch CD5 in CD5 positive B1a-Zellen und CD5 negative B1b-Zellen unterteilt. B1b ist eine Subpopulation der B1a-Zellen, die zwar kein CD5 trägt, aber in anderen Oberflächenmerkmalen identisch mit den B1-Zellen ist. Sowohl B1a- als auch B1b-Zellen können Memory B-Zellen bilden (Alugupalli et al., 2004) (Yang et al., 2012).

Zusammenfassend entstehen Memory B-Zellen somit auf ganz unterschiedliche Weise. Allerdings ist noch unklar ob T-Zell-unabhängige Memory B-Zellen tatsächlich einen intrinsischen Vorteile gegenüber naiven B-Zellen besitzen bzw. ob sie schneller und robuster gegen Antigene reagieren können, so wie es die T-Zell-abhängigen Memory B-Zellen vermögen. Unabhängig ihrer Herkunft können Memory B-Zellen mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD27 näher charakterisiert werden (Agematsu, 2000). Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Memory B-Zellen bei allergischen Immunreaktionen liefert die Publikation von Wong et al. (Wong et al., 2015). In dieser Arbeit wurden allergen-gesteuerte B-Zellen in schnell und langsam teilende Zellen unterteilt. Dabei fiel auf, dass schnell teilenden Zellen, definiert als CD19^{mid}, CD3⁻ und CFSE^{lo}, eine höhere Expression von CD27 ($p=0,008$) und eine niedrigere Expression von CD19 ($p=0,004$) und CD20 ($p=0,004$) zeigten, als B-Zellen die langsamer auf Allergenen reagierten (definiert als CD19^{hi}/CD3⁻/CFSE^{mid}). Außerdem zeigten die schnell teilenden B-Zellen eine höhere Expression des Plasmablastenmarkers CD38 als die langsam Teilenden. Diese schnelle Proliferation von Allergen-aktivierten B-Zellen, in der Veröffentlichung gezeigt anhand von PBMCs allergischer Patienten, ist somit vereinbar mit der Theorie einer frühen Expansion von adaptiven Memory B-Zellen (Tangye, Avery, Deenick & Hodgkin, 2003). Überdies ist die gesteigerte Expression der Oberflächenmarker CD27 und CD38 auf schnell teilenden allergen-antwortenden B-Zellen ein Kennzeichen für hoch aktivierte Memory B-Zellen (Avery et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird der Prozentsatz an CD19⁺/CD27⁺ Memory B-Zellen in den zuvor definierten Patientenkohorten untersucht. Dabei wurde nicht auf die oben beschriebene Möglichkeit eingegangen, die Zellen nochmals näher in CD5⁺ sowie CD5⁻, respektive in B1 und B2-Zellen zu unterteilen. In dem vorliegendem Panel sind CD5 posi-

tive als auch CD5 negative Zellen inkludiert, CD19+/CD5+ B-Zellen werden im Verlauf isoliert betrachtet. Hier wurde bewusst auf eine Unterteilung verzichtet, da man bei der Durchflusszytometrieanalyse mehr Zellen hätte aufnehmen müssen. Des Weiteren wurde in der Auswertung auch nicht der Oberflächenmarker CD38 wie in der Publikation von Wong et al. (Wong et al., 2015) miteinbezogen. Der Grund liegt darin, dass in dieser Untersuchung auch mit Sputumproben gearbeitet wurde und nicht nur mit peripheren venösen Blutzellen. Dies stellt einen viel höheren Anspruch dar. Ziel galt einem möglichst klar strukturiertem Panel, um nach möglichen Zellidentitäten im Sputum zu fahnden, ohne sie schon bis ins letzte Detail zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Allergikersputum (Median: i.s.=6,3% o.s.=28,1%) als auch Kontrollsputum (Median: i.s.=5,3% o.s.=25,0%) außerhalb der Pollenbelastung signifikant höhere CD19+/CD27+ B-Zellspiegel aufweist als während. Der Effekt ist interessanterweise bei Allergikern (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0,0001$) viel deutlicher zu beobachten als bei den Kontrollen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p < 0,05$). Ein deutliches Indiz dafür, dass CD27 positive Memory B-Zellen eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen spielen. Dieser Sachverhalt wurde auch in den oben beschriebenen Publikation vermutet. Die Frage, die sich hier ergibt, ist: Warum ist der Prozentsatz während der Pollenbelastung niedriger als außerhalb? Eine Möglichkeit könnte sein, dass das Immunsystem während der Sommermonate einer vermehrten Allergenexposition ausgesetzt ist, die Zellbildung allerdings etwas "nachhinkt" und die Memory B-Zellspiegel erst zeitversetzt ansteigen. Interessant wäre hier eine Untersuchung des zeitlichen Aspektes, wann die CD19+/CD27+ Zellen sowohl bei den Kontrollen als auch den Allergikern im jahreszeitlichen Verlauf ansteigen und wann wieder ein Rückgang zu verzeichnen ist. Die Begutachtung dieses Aspektes könnte einen weiteren Schritt für die bessere Interpretierbarkeit der Ergebnisse liefern. Innerhalb der einzelnen Subgruppen (Asthmatiker und Immuntherapierte) ist es schwierig eine Aussage zu treffen.

In den PBMCs zeigt sich der selbe Effekt wie im Sputum, allerdings ist nur bei den Allergikern ein signifikanter Anstieg an CD19+/CD27+ B-Zellen außerhalb der Pollensaison zu verzeichnen. Interessanterweise kann man im Sputum, wie schon bei den CD25+ oder den CD27-/CD38+ T-Zellen, deutlich mehr CD27 positive Memory B-Zellen nachweisen als im Blut (Durchschnittswert out-season Allergiker: Sputum=30,98% PBMC=7,75%), somit knapp das vierfache.

B1-B-Zellen

B1a-B-Zellen, charakterisiert durch CD5 positiv, können in Körperhöhlen wie der Pleura- und Peritonealhöhle, aber auch in der Milz gefunden werden (Düber et al., 2009) (Noh & Lee, 2011) und stellen etwa 5% aller B-Zellen im Blut dar (Murphy et al., 2009) (vgl. S.387). Sie entwickeln sich während der Fetalperiode im Splanchnikusgebiet, genannt Omentum, und werden bis ins Erwachsenenalter, wegen ihre Eigenschaft der Selbsterneuerung, beibehalten. B1a-Zellen produzieren natürliche IgM Antikörper (polyreaktiv und monoreaktiv) ohne zuvor offensichtlichen Antigenkontakt (Haas, Poe, Steeber & Tedder, 2005), leben lange und unterliegen keiner extensiven somatischen Hypermutation (Noh & Lee, 2011). Ähnlich zu den Maginalzonen B-Zellen erkennen sie präferenziell T-Zell-unabhängig Antigenen, wie Polysaacheride und Phospholipide (Kantor, 1996). B1-Zellen spielen eine Hauptrolle bei der Entstehung Lymphoproliferativer- und Autoimmunerkrankungen, oft assoziiert mit der Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen körpereigene Antigene.

Das pleuro-peritoneale Milieu scheint entscheidenden Einfluss auf die funktionale Charakteristik der B1a- und B1b- B-Zellen zu nehmen. Man nimmt an, dass B1 Zellen vom Peritoneum zu den mesenterischen Lymphknoten und der intertestinalen Lamina propria wandern können. Die exakten Routen und Mechanismen der Migration sind immer noch Anlass für Debatten. Möglicherweise verlassen sie die Peritonealhöhle auch über das Omentum, um anschließend über die parathymischen Lymphknoten und der Lymphpe, den Blutstrom zu erreichen (Berberich, Förster & Pabst, 2007). Aktivierung und Differenzierung von B1-Zellen werden durch Zytokine wie Il-5 und Il-10 induziert. Aber auch kommensale Bakterien, die von dendritischen Zellen in der intestinalen Lamina propria präsentiert werden, können einen Beitrag zur Aktivierung leisten. B1 B-Zellen selbst können zu einer T-Zell unabhängigen IgA Antwort in der Mukosa beitragen. Zudem können LPS und andere TLR-Liganden sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von B1-Zellen in IgM sekretierende kurzlebige Plasmazellen induzieren (Ha et al., 2006). B1- Zellen spielen somit eine entscheidende Rolle bei immunologischen Prozessen. Auch in der Allergieforschung wird ihnen ein wichtiger Betrag beigemessen.

In zwei kürzlich veröffentlichten Studien konnten Forscher zeigen, dass hohe Anteile an CD5 positiven B-Zellen im Blut von Kleinkindern, die Entwicklung von allergischen Erkrankungen im höheren Alter wahrscheinlicher werden lassen. Es konnte gezeigt werden, dass Neugeborene, die einen hohen Spiegel an CD5 positiven B-Zellen zum Zeitpunkt der Geburt und einen Monat später hatten, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung allergischer Erkrankungen in einem Alter von 18 und 36 Monaten tragen. Außerdem korrelierten die

CD5+ B-Zellspiegel, gemessen nach einem Monat Lebenszeit, invers mit dem Gesamt-IgG, gemessen nach 18 und 36 Monaten. Diese Ergebnisse postulieren, dass die Entwicklung von allergischen Erkrankungen bei einem hohen Spiegel an unreifen neonatalen B-Zellen begünstigt wird (Lundell et al., 2014).

Im Rahmen dieser FARMFLORA-Studie konnte in einer weiteren Publikation ein positiver Beweis für die Hygienetheorie im Zusammenhang mit B1-B-Zellen erbracht werden. BAFF, ein B-Zell aktivierende Faktor, ist ein wichtiges Zytokin bei der B-Zellentwicklung. Es stellte sich heraus, dass der BAFF-Spiegel gemessen im zirkulierenden Blut, zum Zeitpunkt der Geburt bei allen Studienteilnehmern am höchsten war. Allerdings fiel auf, dass Kinder von Farmen einen deutlich höheren Spiegel zeigten als Nichtfarm-Kinder. Diese höheren BAFF-Spiegel bei der Geburt sind wiederum positiv assoziiert mit dem erhöhten Anteil an CD27+ Memory B-Zellen und korrelieren invers mit den CD5+ B-Zellspiegeln (sprich B1-B-Zellen) (Lundell et al., 2015).

Kombiniert man nun die Aussagen beider Veröffentlichungen, kann man die Aussage treffen, dass Kinder von Farmen niedrigere Spiegel an CD5+ B-Zellen bei Geburt besitzen. Das scheint wiederum ein positiver Prädiktor zu sein, um später nicht an allergischen Erkrankungen zu leiden.

Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser Arbeit fällt auf, dass sich die B1-B-Zellen im Sputum in höherer Quantität darstellen lassen als im Blut. Dieses Ergebnis könnte in Konkordanz mit der oben beschriebenen Entwicklungsgeschichte stehen. B1-B-Zellen halten sich bevorzugt in Körperhöhlen, wie der Peritoneal- oder Pleurahöhle auf. Somit wäre es durch den räumlichen Bezug der Pleurahöhle zum Lungengewebe möglich, auch mehr B1 B-Zellen im Sputum zu finden. Daraus wurde eine Arbeitshypothese mit der Frage abgeleitet: kann man B1-B-Zellen im Sputum in höherer Quantität darstellen, als im Blut?

Tabelle 5.1: Prozentualer Anteil an CD19+/CD5+ B-Zellen

| | Kontrollen i.s | Kontrollen o.s. | Allergiker i.s. | Allergiker o.s. |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Sputum: | | | | |
| Mittelwert in % | 2,86 | 16,27 | 2,12 | 9,77 |
| Median in % | 0,00 | 8,30 | 0,00 | 4,05 |
| PBMCs: | | | | |
| Mittelwert in % | 3,70 | 0,23 | 4,11 | 0,23 |
| Median in % | 2,85 | 0,15 | 3,60 | 0,00 |

Diese These konnte belegt werden, da sowohl die Mediane als auch die Durchschnittswerte für den prozentualen Anteil an B1-B-Zellen im Sputum höher liegen als im Blut, wie aus Tabelle 5.1 ersichtlich wird. Dieser Effekt bekräftigt die Theorie, dass Sputum ein probates Medium ist, um Entzündungs- aber auch allergische Reaktionen in der Lunge darzustellen. In mehreren Publikationen wird der Prozentsatz an B1-B-Zellen an den Gesamt B-Zellen auf 5 % (Murphy et al., 2009) (vgl. S.387) im Blut angenommen. Diese Werte werden auch hier annähernd im peripheren Blut erreicht, allerdings nur während der Pollensaison. Nach Recherche auf PubMed konnte keine Veröffentlichung gefunden werden, die den jahreszeitlichen Verlauf von B1-B-Zellen untersuchte. Analysiert man die Daten, fällt zudem auf, dass sich die Zellprozentätze von CD5 positiven B-Zellen in Sputum und Blut genau invers verhalten. Im Sputum findet man deutlich mehr B1-B-Zellen außerhalb der Pollenbelastung, sowohl bei den Allergikern als auch bei den Kontrollen. Im Blut hingegen werden die Spitzenwerte in-season erreicht und fallen out-season ab. Interessant ist zudem, dass sich dieses inverse Ergebnis nur bei den CD5 positiven B-Zellen zeigt, bei allen anderen Subpopulationen wie CD25+ oder CD27-/CD38+ Zellen verhalten sich die Ergebnisse für Sputum als auch PBMCs immer gleichsinnig. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden.

Plasmazellen

Plasmazellen bilden sich durch Proliferation und Differenzierung aus B-Lymphozyten, nachdem ein Antigen an den B-Zell-Antigenrezeptor oder B-Zell-Rezeptor (BCR) auf ihrer Oberfläche gebunden hat. Plasmazellen sind somit die Effektorzellen der B-Lymphozyten und können Antikörper produzieren (Murphy et al., 2009) (vgl. S.13). Die Differenzierung geht einher mit vielen morphologischen Veränderungen. Zuerst entwickeln sich Plasmazellen, die sich weiterhin teilen können. Diese sterben dann entweder nach einigen Tagen ab oder werden zu Plasmazellen, von denen einige in den lymphatischen Organen bleiben. Die Mehrzahl jedoch wandert in das Knochenmark und setzt dort ihre Antikörperproduktion fort. Ihre Lebensdauer variiert beträchtlich, von wenigen Tagen bis Wochen, zu sehr langlebigen Zellen, die verantwortlich sind, dass Antikörperreaktionen bestehen bleiben (Murphy et al., 2009) (vgl. S.489). Es ist schon seit längerem bekannt, dass CD138, ein Protein der Syndecan-Proteinfamilie, ein geeigneter Oberflächenmarker ist, um sowohl gesunde als auch maligne Plasmazellen zu kennzeichnen (Chilosi et al., 1999) (Costes et al., 1999).

Um sich einen Überblick zu verschaffen, ob Plasmazellen auch im Sputum vorhanden sind, wurde in der vorzuliegenden Arbeit CD138 verwendet. Wie oben beschrieben, wandern Plasmazellen sehr bald ins Knochenmark, nur wenige verbleiben in den lymphatischen Organen und werden somit eigentlich kaum in der Peripherie gefunden. Wir können diesen Sachverhalt dokumentieren und zudem zeigen, dass der Prozentsatz an Plasmazellen im Blut sich jahreszeitenunabhängig unter einem Prozent bei Allergikern und Kontrollen bewegt.

Im Sputum hingegen zeigt sich bei den Allergikern ein Mittelwert von 0,4% in-season und 6,5% out-season von CD138 positiven B-Zellen. Dieser Anstieg kann statistisch als signifikant betrachtet werden. Außerdem ist hervorzuheben, dass der Prozentsatz an gefundenen Plasmazellen im Sputum deutlich über dem gemessenen Wert im peripheren Blut liegt. Sputum wäre somit auch für weitere Vorhaben im Bereich der Plasmazellforschung durchaus ein zu diskutierendes Medium. Biopsien aus dem Knochenmark sind deutlich risikoreicher, sowohl für Patienten als auch Probanden und könnten somit vermieden werden.

Regulatorische B-Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, lassen sich regulatorische B-Zellen (Bregs) ebenso wie regulatorische T-Zellen, funktionell in verschiedene Untergruppen einordnen. Beiden ist gemeinsam, inflammatorische Antworten zu unterdrücken und Immuntoleranz zu induzieren (Blair et al., 2010) (Mauri et al., 2003). Ein einheitlicher Phänotyp für Bregs kann nicht benannt werden, vielmehr wurden verschiedene B-Zellsubtypen beschrieben, die eine regulatorische Funktion haben. Zu denen zählen auch CD5+ B1a-B-Zellen (Noh & Lee, 2011), CD19hi/CD1dhi/CD5+ (Matsushita et al., 2008) (Yanaba et al., 2008) und CD19+/CD24hi/CD38hi (Blair et al., 2010). Außerdem wurde ein IL-10 kompetenter B-Zellsubtyp im Humanen gefunden, der regulatorische Eigenschaften besitzt und phänotypisch durch CD24hi/CD27+/CD19+ charakterisiert wurde (Iwata et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die oben genannten Erkenntnisse verwendet und somit CD19, CD5, CD1d, CD27, CD24 und CD38 in das Durchflusszytometrie-Panel aufgenommen, um mögliche regulatorische B-Zellpopulationen im Sputum phänotypisch näher zu charakterisieren. Dabei wurde nicht auf ihre funktionellen Eigenschaften eingegangen, da man dazu die Zellen sortieren und kultivieren müsste, ein Schritt für zukünftige Projekte. Die Kernaussage ist, dass man im humanen Sputum mögliche B-regulatorische Zellen detektieren kann. Es wurde nach folgenden Subtypen gescreent:

1. CD19+/CD1d+/CD5+
2. CD19+/CD24+/CD38+
3. CD19+/CD24hi/CD27+

Dabei wurde bewusst auf die in den vorhergehenden Publikationen "hi"-Einstellungen verzichtet (bis auf einmal), da es nicht eindeutig ist, innerhalb einer sehr kleinen Positivgruppe (bestimmt durch FMOs und Single Colour) mit Sicherheit eine Grenze zwischen der hi- und low-Population zu ziehen. Dafür müssten in einem weiteren Schritt mehr Zellen aufgenommen werden, um eine sichere Unterteilung zu gewährleisten.

Bei den Ergebnissen zeigt sich, dass Allergiker außerhalb der Pollensaison einen signifikant höheren Prozentsatz an CD19+/CD1d+/CD5+ B-Zellen im Sputum besitzen als innerhalb. Diesen Effekt beobachtet man bei den Kontrollen nicht. Im peripheren Blut kann man die gleiche Tendenz beobachten, allerdings ist diese Sub-B-Zellpopulation nie größer als 0,6% von der Gesamt-B-Zellpopulation. Im Sputum hingegen werden Werte bei einzelnen Patienten zwischen 3-15% erreicht. Dieses Ergebnisse lassen vermuten, dass der

B-Zellsubtyp CD19+/CD1d+/CD5+ vermehrt im Sputum als im Blut anzutreffen ist. Umgekehrt verhält es sich bei der CD19+/CD24+/CD38+ B-Zellpopulation, die fast ausschließlich im Blut zu finden ist. Hier werden Anteile von bis zu 10% bei den PBMCs beobachtet, im Sputum hingegen fast gar keine. Im Blut zeigt sich bei diesem Subtyp zudem, dass deutlich höhere Prozentsätze in der Pollensaison bzw. Allergenbelastung vorzufinden sind als außerhalb. Statistisch signifikant ist dieses Ergebnis nur bei den Allergikern. Betrachtet man die CD19+/CD24hi/CD27+ Zellpopulation im Sputum zeigt sich, dass diese Subpopulation fast ausschließlich bei Allergikern vorkommt und dies mit Werten bis zu 10%. Ein signifikanter Unterschied zwischen Allergenbelastung und keiner konnte nicht festgestellt werden, vielmehr scheinen die Spiegel bei den Allergikern unabhängig der Pollensaison zu persistieren. Ähnliche Effekte zeigen sich auch im Blut. Hier findet man deutlich mehr Zellen bei den Allergikern als bei den Kontrollen, zu dem kommt es out-season zu einem signifikanten Abfall dieser CD19+/CD24+/CD27+ B-Zellpopulation.

Diese Ergebnisse, vor allem durch den Vergleich von Sputum- mit den peripheren Blutdaten, legen den Verdacht nahe, dass es sich bei den einzelnen phänotypisch unterschiedlich klassifizierten B-Zellsubpopulationen um "eigenständige" Untergruppen handeln muss. Es scheint als würde jeder Subtyp eigene Aufgaben zu unterschiedlichen Zeiten wahrnehmen. Auch tauchen sie in den verschiedenen Medien (Blut und Sputum) in ganz unterschiedlichen Häufigkeiten auf. Bei all den anderen zuvor beschriebenen T- und B-Zellsubpopulationen zeigen sich fast durchweg 4-5 fach höhere Prozentsätze an Zelllast im Sputum als im Blut. Diesen Effekt beobachtet man bei den möglichen B-regulatorischen Zellen nicht, vielmehr ist hier eine detaillierte Charakterisierung der einzelnen Subpopulationen notwendig.

5.3 Korrelation mit klinischen Daten

Im Ergebnisteil unter der Rubrik - Korrelation mit klinischen Daten - wurden Diagramme vorgestellt, die explorativ versuchen, klinisch messbare Reaktionen oder Symptome mit Labordaten zusammenzubringen. Wichtig für die medizinische Forschung sollte auch immer der Bezug zum Patienten und seinen tatsächlichen Beschwerden darstellen. Im folgenden wurde versucht diesem Anspruch Rechnung zu tragen. Man entschied sich für zwei Subpopulationen, den CD25+ und den CD27-/CD38+ T-Zellen. Beide spielen nachgewiesenermaßen eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen, außerdem sind sie mit einem aussagekräftigen Prozentsatz im Blut und Sputum vorhanden.

Als erstes wurden nun die Prozentsätze dieser Subpopulationen gemessen bei Allergikern während der Pollenbelastung, sowohl im Sputum als auch im peripheren Blut, mit den dazugehörigen IgE-Spiegeln im Serum korreliert. Antikörper vom IgE-Typ treten normalerweise nur in geringen Mengen im Blut auf. Zusammen mit Mastzellen sind sie für allergische Erkrankungen, wie Heuschnupfen, Asthma und Neurodermitis verantwortlich, können allerdings auch bei anderen systemischen Erkrankungen erhöht sein. Werte bis zu 100kU/l bei Erwachsenen sind noch im Normbereich. Bei dieser Korrelation konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden.

Interessanterweise zeigen sich signifikante Effekte bei der Korrelation der CD25 positiven T-Zell-Population mit der Hauttestung, dem sogenannten Prick-Test. Dabei wurde der Prozentsatz dieser Zellen gemessen im Sputum mit dem direkten Quaddeldurchmesser der Gräserpollentestung korreliert. Es zeigt sich, dass Patienten mit einem starken Hautbefund prozentual weniger CD25 positive T-Zellen im Sputum haben. Da der direkte Durchmesser nicht so aussagekräftig ist, wurde ein neuer Quotient eingeführt. Bei diesem wurde die Quaddelgröße, hervorgerufen durch ein beliebiges Allergen, auf die Positiv-Quaddel (hier: Histamin) referenziert. Das bedeutet, dass ein Patient bei einem Wert von fünf, eine im Durchmesser 5 mal so große Hautreaktion auf das Allergen zeigt, wie auf Histamin (Positivkontrolle). Somit kann eine objektivere Beurteilung gewährleistet werden. Zum Beispiel gibt es einen Patienten X, der eine 2 cm große Histaminquaddel und eine 3cm große Gräserpollenquaddel besitzt. Patient Y hingegen reagiert auf Histamin mit einer 3mm Quaddel, auf Gräserpollen hingegen mit einer 1cm Quaddel. Ohne den neuen Quotienten hätte Patient X eine deutlich größere Hautreaktion als Patient Y, berechnet man den Quotienten hingegen erhält man für X einen Wert von 1,5 und für Y einen Wert von 3. Korreliert man nun diesen neu gefundenen Quotienten mit den im Labor gemessenen Daten, zeigt sich ein signifikantes Ergebnis beim Sputum, im Blut hingegen nicht. Verglichen wurde die Gräser-

pollenquaddel, da eine Negativ-Reaktion hier ein Ausschlusskriterium dargestellt hätte. Da nun viele Patienten nicht isoliert an einer Gräserpollenallergie leiden, wurden zusätzlich eine Sensibilisierung gegen Birkenpollen akzeptiert. Da die Birke in etwa zeitgleich mit den Gräsern blühen kann, abhängig von der allgemeinen Wetterlage, wurde die oben beschriebene Korrelation auch mit der Birkenpollenquaddel und dem "Birkenpollenquotienten" durchgeführt. Interessanterweise zeigen sich hier konkordante Ergebnisse, die Daten im Sputum korrelieren signifikant mit der Hauttestung, die aus dem Blut hingegen nicht.

In Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln möglicherweise Zellen, die am Ort des Entzündungsgeschehens isoliert werden, einen deutlicheren Zusammenhang mit der Erkrankung wieder als Probenmaterial aus dem Blut. Blutproben stellen im klinischen Alltag nach wie vor den Goldstandard dar, da die Gewinnung leicht und nicht zeitaufwendig ist. Gleichzeitig sollte allerdings überlegt werden, wie repräsentativ dieses Medium für ein lokales Entzündungsgeschehen ist, da systemische Werte dargestellt werden und keine Momentaufnahmen vor Ort.

Literaturverzeichnis

- Accordini, S., Corsico, A., Cerveri, I., Gislason, D., Gulsvik, A., Janson, C., Jarvis, D., Marcon, A., Pin, I., Vermeire, P., Almar, E., Bugiani, M., Cazzoletti, L., Duran-Tauleria, E., Jōgi, R., Marinoni, A., Martínez-Moratalla, J., Leynaert, B., De Marco, R., Ackermann-Liebrich, U., Antó, J. M., Burney, P., Chinn, S., Gislason, T., Heinrich, J., Knox, J., Künzli, N., Luczynska, C., Neukirch, F., Schouten, J., Sunyer, J., Svanes, C. & Wjst, M. (2008). The socio-economic burden of asthma is substantial in Europe. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *63* (1), 116–124. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01523.x
- Agematsu, K. (2000, apr). Memory B cells and CD27. *Histology and Histopathology*, *15* (2), 573–6. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10809378>
- Ait-Khaled, N., Pearce, N., Anderson, H. R., Ellwood, P., Montefort, S., Shah, J., Asher, M. I., Beasley, R., Björkstén, B., Brunekreef, B., Crane, J., Foliaki, S., García-Marcos, L., Keil, U., Lai, C. K. W., Mallol, J., Robertson, C. F., Mitchell, E. a., Odhiambo, J., Stewart, a. W., Strachan, D., Von Mutius, E., Weiland, S. K., Weinmayr, G., Williams, H. & Wong, G. (2009). Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *64* (1), 123–148. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01884.x
- Alugupalli, K. R., Leong, J. M., Woodland, R. T., Muramatsu, M., Honjo, T. & Gerstein, R. M. (2004). B1b Lymphocytes Confer T cell-Independent Long-Lasting Immunity. *Immunity*, *21* (3), 379–90. Zugriff auf <http://www.cell.com/article/S1074761304002146/fulltext> doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.019
- Amat, F., Saint-Pierre, P., Bourrat, E., Nemni, A., Couderc, R., Boutmy-Deslandes, E., Sahraoui, F., Pansé, I., Bagot, M., Fouéré, S. & Just, J. (2015). Early-Onset Atopic Dermatitis in Children: Which Are the Phenotypes at Risk of Asthma? Results from the ORCA Cohort. *Plos One*, *10* (6), 1–14. Zugriff auf <http://dx.plos.org/>

- 10.1371/journal.pone.0131369 doi: 10.1371/journal.pone.0131369
- Avery, D. T., Ellyard, J. I., Mackay, F., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D. & Tangye, S. G. (2005). Increased Expression of CD27 on Activated Human Memory B Cells Correlates with Their Commitment to the Plasma Cell Lineage. *The Journal of Immunology*, 174 (7), 4034–4042. Zugriff auf <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.174.7.4034> doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4034
- Badura, B., Beermann, B., Behr, M., Brenscheidt, F., Bütetisch, T., Cornelißen, W., Dreschel, C., Elsigan, G., Faltermaier, T., Fischer, E. & Zok, K. (2007). *Fehlzeiten-Report 2007: Arbeit, Geschlecht und Gesundheit* (C. Badura, B., Schröder, H., Vetter, Hrsg.). Heidelberg: Springer Verlag.
- Bailey-Bucktrout, S. L. & Bluestone, J. A. (2011). Regulatory T cells: stability revisited. *Trends in Immunology*, 32 (7), 301–306. doi: 10.1007/s11103-011-9767-z
- Behrendt, H. & Ring, J. (2012). Climate change, environment and allergy. *Chemical Immunology and Allergy*, 96, 7–14. doi: 10.1159/000331804
- Berberich, S., Förster, R. & Pabst, O. (2007). The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. *Blood*, 109 (11), 4627–4634. doi: 10.1182/blood-2006-12-064345
- Biermann, J., Merk, H., Wehrmann, W., Klimek, L. & Wasem, J. (2013). Allergische Erkrankungen der Atemwege. Ergebnisse einer umfassenden Patientenkohorte in der deutschen gesetzlichen Krankenversicherung. *Allergo J*, 22 (6), 366–73. Zugriff auf http://www.aeda.de/fileadmin/user_{_}upload/PDF/Aktuelles/2013/Wasem-Studie_{_}dt.pdf
- Blair, P., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. a., Ehrenstein, M. R. & Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, 32 (1), 129–140. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009
- Blaiss, M. S. (2007). Allergic rhinoconjunctivitis: Burden of disease. *Allergy and Asthma Proceedings*, 28 (4), 393–397. doi: 10.2500/aap.2007.28.3013
- Bouaziz, J. D., Yanaba, K. & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunological Reviews*, 224 (1), 201–214. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00661.x
- Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H. J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G. W., Chapman, M. D., Creticos, P. J., Dayer, J. M., Durham, S. R., Demoly, P., Goldstein, R. J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P. H., Lowenstein, H., Muller, U., Norman,

- P. S., Reisman, R. E., Valenta, R., Valovirta, E. & Yssel, H. (1998). Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102 (4 I), 558–562. doi: 10.1016/S0091-6749(98)70271-4
- Bousquet, J., van Cauwenberge, Paul Khaltsev, N. & in collaboration with WHO. (2001). Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (5), 147–334. doi: 10.1046/j.1472-9725.2003.00063.x
- Cataldo, D., Foidart, J. M., Lau, L., Bartsch, P., Djukanovic, R. & Louis, R. (2001, dec). Induced sputum: comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest*, 120 (6), 1815–21. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742907>
- Chakra, O., Sutra, J. P., Thomas, E., Vinh, J., Lacroix, G., Poncet, P. & Sénéchal, H. (2012). Proteomic analysis of Major and Minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules. *Journal of Proteome Research*, 11 (2), 1208–1216. doi: 10.1021/pr200923f
- Chilosi, M., Adami, F., Lestani, M., Montagna, L., Cimarosto, L., Semenzato, G., Pizzolo, G. & Menestrina, F. (1999, dec). CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Modern Pathology*, 12 (12), 1101–6. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619261>
- Chodosh, S., Zaccheo, C. W. & Segal, M. S. (1962, may). The cytology and histochemistry of sputum cells. I. Preliminary differential counts in chronic bronchitis. *The American Review of Respiratory Disease*, 85 (5), 635–48. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13879121>
- Costes, V., Magan, V., Legouffe, E., Durand, L., Baldet, P., Rossi, J., Klein, B. & Brochier, J. (1999, dec). The Mi15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Human Pathology*, 30 (12), 1405–1411. Zugriff auf <http://www.humanpathol.com/article/S0046817799901600/fulltext> doi: 10.1016/S0046-8177(99)90160-0
- D'Amato, G., Holgate, S. T., Pawankar, R., Ledford, D. K., Cecchi, L., Al-Ahmad, M., Al-Enezi, F., Al-Muhsen, S., Ansotegui, I., Baena-Cagnani, C. E., Baker, D. J., Bayram, H., Bergmann, K. C., Boulet, L.-P., Buters, J. T. M., D'Amato, M., Dorsano, S., Douwes, J., Finlay, S. E., Garrasi, D., Gómez, M., Haahtela, T., Halwani, R., Hassani, Y., Mahboub, B., Marks, G., Michelozzi, P., Montagni, M., Nunes, C., Oh, J. J.-W., Popov, T. a., Portnoy, J., Ridolo, E., Rosário, N., Rottem, M., Sánchez-Borges, M., Si-

- banda, E., Sienra-Monge, J. J., Vitale, C. & Annesi-Maesano, I. (2015). Meteorological conditions, climate change, new emerging factors, and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organization Journal*, 8 (25), 1–52. Zugriff auf <http://www.waojournal.org/content/8/1/25> doi: 10.1186/s40413-015-0073-0
- Davies, J. M. (2014). Grass pollen allergens globally: The contribution of subtropical grasses to burden of allergic respiratory diseases. *Clinical & Experimental Allergy*, 44 (6), 790–801. doi: 10.1111/cea.12317
- De Marco, R., Cappa, V., Accordini, S., Rava, M., Antonicelli, L., Bortolami, O., Braggion, M., Bugiani, M., Casali, L., Cazzoletti, L., Cerveri, I., Fois, a. G., Girardi, P., Locatelli, F., Marcon, a., Marinoni, a., Panico, M. G., Pirina, P., Villani, S., Zanolin, M. E. & Verlato, G. (2012). Trends in the prevalence of asthma and allergic rhinitis in Italy between 1991 and 2010. *European Respiratory Journal*, 39 (4), 883–892. doi: 10.1183/09031936.00061611
- Düber, S., Hafner, M., Krey, M., Lienenklaus, S., Roy, B., Hobeika, E., Reth, M., Buch, T., Waisman, A., Kretschmer, K., Weiss, S., Du, S., Hafner, M., Krey, M., Lienenklaus, S., Roy, B., Hobeika, E., Reth, M., Buch, T., Waisman, A., Kretschmer, K. & Weiss, S. (2009). Induction of B-cell development in adult mice reveals the ability of bone marrow to produce B-1a cells. *Blood*, 114 (24), 4960–4967. doi: 10.1182/blood-2009-04-218156
- Francis, J. N., James, L. K., Paraskevopoulos, G., Wong, C., Calderon, M. a., Durham, S. R. & Till, S. J. (2008). Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121 (5), 1120–25.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2008.01.072
- Gershman, N. H., Liu, H., Wong, H. H., Liu, J. T. & Fahy, J. V. (1999, aug). Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (2), 322–328. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10452752>
- Gibson, P. G. (1998, jan). How to measure airway inflammation: induced sputum. *Canadian Respiratory Journal: Journal of the Canadian Thoracic Society*, 5 Suppl A, 22A–6A. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753512>
- Golding, A., Hasni, S., Illei, G. & Shevach, E. M. (2013). The percentage of FoxP3+Helios+treg cells correlates positively with disease activity in systemic lupus Erythematosus.

- Arthritis & Rheumatology*, 65 (11), 2898–2906. doi: 10.1002/art.38119
- Grant, C. R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. & Longhi, M. S. (2015, feb). Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and–yet–unanswered questions. *Autoimmunity Reviews*, 14 (9), 845–6. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25449680> doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.012
- Ha, S.-a., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T. & Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 203 (11), 2541–2550. doi: 10.1084/jem.20061041
- Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. a. & Tedder, T. F. (2005). B-1a and B-1b Cells Exhibit Distinct Developmental Requirements and Have Unique Functional Roles in Innate and Adaptive Immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 23 (1), 7–18. Zugriff auf <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761305001433> doi: 10.1016/j.immuni.2005.04.011
- Haftenberger, M., Laußmann, D., Ellert, U., Kalcklösch, M., Langen, U., Schlaud, M., Schmitz, R. & Thamm, M. (2013). Prävalenz von Sensibilisierungen gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56 (5-6), 687–697. doi: 10.1007/s00103-012-1658-1
- Hansel, T. T. & Walker, C. (1992, mar). The migration of eosinophils into the sputum of asthmatics: the role of adhesion molecules. *Clinical and Experimental Allergy*, 22 (3), 345–56. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1586874>
- Hawrylowicz, C. M. (2005). Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 202 (11), 1459–1463. Zugriff auf <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20052211> doi: 10.1084/jem.20052211
- Holz, O., Jörres, R. A., Koschyk, S., Speckin, P., Welker, L. & Magnussen, H. (1998, mar). Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clinical and Experimental Allergy*, 28 (3), 284–92. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9543077>
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., Szabolcs, P. M., Bernstein, S. H., Magro, C. M., Williams, A. D., Hall, R. P., St Clair, E. W. & Tedder, T. F. (2011, jan). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117 (2), 530–41. Zugriff auf </pmc/articles/PMC3031478/?report=abstract> doi: 10.1182/blood-2010-07-294249

- Jacobsen, L., Wahn, U. & Bilo, M. B. (2012). Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clinical and translational allergy*, 2 (1), 8. Zugriff auf <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3348084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> doi: 10.1186/2045-7022-2-8
- Janeway, C., Sharrow, S. & Simpson, E. (1975). T cell populations with different functions. *Nature*, 253 (5492), 544–46.
- John, J. (2002). Volkswirtschaftliche Kosten von Asthma und Allergien. *mensch+umwelt spezial* (15), 45–50.
- Kantor, A. B. (1996). V-gene usage and N-region insertions in B-1a, B-1b and conventional B cells. *Seminars in Immunology*, 8 (1), 29–35. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8850296> doi: 10.1006/smim.1996.0005
- Kearley, J., Barker, J., Robinson, D. & Lloyd, C. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *Journal of Experimental Medicine*, 202 (11), 1539–1547. Zugriff auf <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20051166> doi: 10.1084/jem.20051166
- Kemp, A. S. (2009, jun). Allergic rhinitis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 10 (2), 63–68. Zugriff auf <http://www.prrjournal.com/article/S1526054209000165/fulltext> doi: 10.1016/j.prrv.2009.02.002
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.-A. & Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology*, 4 (4), 337–342. doi: 10.1038/ni909
- Kleine-Tebbe, J., Bergmann, K.-C., Friedrichs, F., Fuchs, T., Jung, K., Klimek, L., Kühr, J., Lässig, W. & Worm, M. (2006). Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. *Allergo Journal*, 15, 56–74.
- Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15 (3), 149–159. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677494> doi: 10.1038/nri3802
- Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Neves, P., Shen, P., Stervbo, U., Boudinot, P., Anderton, S. M. & Fillatreau, S. (2010). Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity.

- Immunological Reviews*, 233 (1), 146–161. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00855.x
- Langen, U., Schmitz, R. & Steppuhn, H. (2013). Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. Ergebnisse der Studie zur gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 56 (5-6), 698–706. doi: 10.1007/s00103-012-1652-7
- Lewkowich, I., Herman, N., Schleifer, K., Dance, M., Chen, B., Dienger, C., Sproles, A., Shah, J., Köhl, J., Y., B. & Wills-Karp, M. (2005). CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *Journal of Experimental Medicine*, 202 (11), 1549–1561. Zugriff auf <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20051506> doi: 10.1084/jem.20051506
- Liu, W., Putnam, A., Xu-Yu, Z., Szot, G., Lee, M., Zhu, S., Gottlieb, P., Kapranov, P., Gingeras, T., Fazekas de St Groth, B; Clayberger, C., Soper, D., Ziegler, S. & Bluestone, J. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203 (7), 1701–1711. Zugriff auf <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20060772> doi: 10.1084/jem.20060772
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie* (3. Aufl.). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Lundell, A., Hesselmar, B., Nordström, I., Adlerberth, I., Wold, A. E. & Rudin, A. (2015). Higher B-cell activating factor levels at birth are positively associated with maternal dairy farm exposure and negatively related to allergy development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136 (4), 1074–1082.e3. Zugriff auf <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674915004261> doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.022
- Lundell, A., Johansen, S., Adlerberth, I., Wold, a. E., Hesselmar, B. & Rudin, A. (2014). High Proportion of CD5+ B Cells in Infants Predicts Development of Allergic Disease. *The Journal of Immunology*, 193 (2), 510–518. Zugriff auf <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302990> doi: 10.4049/jimmunol.1302990
- Maecker, H. T., McCoy, J. P. & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology*, 12 (3), 191–200. doi: 10.1038/nri3229
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *Journal of Clinical Investigation*, 118 (10), 3420–3430. doi: 10.1172/JCI36030

- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. & Londei, M. (2003, feb). Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197 (4), 489–501. Zugriff auf <http://jem.rupress.org.emedien.ub.uni-muenchen.de/content/197/4/489.long> doi: 10.1084/jem.20021293
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taffin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G. & Sakaguchi, S. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*, 30 (6), 899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
- Moll, I., Bahmer, J., Bayerl, C., Augustin, M. & Bahmer, F. (2010). *Duale Reihe, Dermatologie* (7. Aufl.; I. Moll, Hrsg.). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Moodley, Y. P., Krishnan, V. & Lalloo, U. G. (2000). Neutrophils in induced sputum arise from central airways. *European Respiratory Journal*, 15 (1), 36–40.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Janeway's Immunologie* (7. Aufl.; K. Mahleke, Hrsg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Noh, G. & Lee, J. H. (2011). Regulatory B Cells and Allergic Diseases. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 3 (3), 168–177. Zugriff auf <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4168/aaair.2011.3.3.168> doi: 10.4168/aaair.2011.3.3.168
- Obukhanych, T. V. & Nussenzweig, M. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203 (2), 305–310. Zugriff auf <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20052036> doi: 10.1084/jem.20052036
- Panzner, P., Vachová, M., Vítovcová, P., Brodská, P. & Vlas, T. (2014). A comprehensive analysis of middle-european molecular sensitization profiles to pollen allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 164 (1), 74–82. doi: 10.1159/000362760
- Pariente, P. D., LePen, C., Los, F. & Bousquet, J. (1997, nov). Quality-of-life outcomes and the use of antihistamines in a French national population-based sample of patients with perennial rhinitis. *Pharmacoeconomics*, 12 (5), 585–95. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10174325>
- Pearce, N. W., Dorsch, S. E. & Hall, B. M. (1990, sep). Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. IV. Examination of T cell subsets in graft-versus-host assays. *Transplantation*, 50 (3), 493–7. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1976283>

- Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Efthimiadis, A., Hargreave, F. E. & Dolovich, J. (1996, jun). Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *The European Respiratory Journal*, 9 (6), 1174–80. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804934>
- Popov, T., Gottschalk, R., Kolendowicz, R., Dolovich, J., Powers, P. & Hargreave, F. E. (1994, aug). The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clinical & Experimental Allergy*, 24 (8), 778–83. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982128>
- Renz, H., Agnes, K. & Pfefferle, P. I. (2008). *Allergieforschung in Deutschland. Ein Atlas mit Bestandsaufnahme, Defizit- und Bedarfsanalyse* (Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), Hrsg.). Marburg. Zugriff auf <http://dgaki.de/wp-content/uploads/2010/05/Allergieforschung{ }in{ }Deutschland{ }Aktualisierte-Version1.2.pdf>
- RKI & BZgA. (2008). *Erkennen – Bewerten – Handeln: Zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland*. (Robert-Koch-Institut, Hrsg.). Berlin.
- Robinson, D. S., Larché, M. & Durham, S. R. (2004). Review series Tregs and allergic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 114 (10), 1389–97. doi: 10.1172/JCI200423595.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Masanao, A., Misako, I. & Masaaki, T. (1995). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *Journal of Immunology*, 155 (3), 1151–64.
- Santegoets, S. J. a. M., Dijkgraaf, E. M., Battaglia, A., Beckhove, P., Britten, C. M., Gallimore, A., Godkin, A., Gouttefangeas, C., de Gruijl, T. D., Koenen, H. J. P. M., Scheffold, A., Shevach, E. M., Staats, J., Taskén, K., Whiteside, T. L., Kroep, J. R., Welters, M. J. P. & van der Burg, S. H. (2015). Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64 (10), 1271–1286. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122357> doi: 10.1007/s00262-015-1729-x
- Satoguina, J. S., Adjobimey, T., Arndts, K., Hoch, J., Oldenburg, J., Layland, L. E. & Hoerauf, A. (2008). Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta. *European Journal of Immunology*, 38 (11), 3101–3113. doi: 10.1002/eji.200838193

- Schäfer, T., Bauer, C. P., Beyer, K., Bufe, A., Friedrichs, F., Gieler, U., Gronke, G., Hamelmann, E., Hellermann, M., Kleinheinz, A., Klimek, L., Koletzko, S., Kopp, M. V., Lau, S., Müsken, H., Reese, I., Schmidt, S., Schnadt, S., Sitter, H., Strömer, K., Vagts, J., Vogelberg, C., Wahn, U., Werfel, T. & Worm, M. (2014). AWMF-Register Nr. 061/016 Klasse: S3. , 1–30.
- Schäfer, T., Borowski, C., Diepgen, T. L., Hellermann, M., Piechotowski, I., Reese, I., Roos, T., Schmidt, S., Sitter, H., Werfel, T. & Gieler, U. (2004). Evidenzbasierte und konsentierete Leitlinie - Allergieprävention. Evidence-based and consented guideline on allergy prevention. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology (JDDG)*, 2 (12), 1030–1036,1038. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}list{ }uids=16285318{&}dopt=Abstract>
- Schlaud, M., Atzpodien, K. & Thierfelder, W. (2007). Allergische Erkrankungen: Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 50 (5-6), 701–710. doi: 10.1007/s00103-007-0231-9
- Schmitz, R., Kuhnert, R. & Thamm, M. (2017). 12-Monats-Prävalenz von Allergien in Deutschland. *Journal of Health Monitoring*, 2 (1), 77–82. doi: 10.17886/RKI-GBE-2017-011
- Seddiki, N. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203 (7), 1693–1700. Zugriff auf <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20060468> doi: 10.1084/jem.20060468
- Senekamp, J., Fuchs, T., Hornung, B., Kersten, W., Klimek, L., Leupold, W., Merk, H. & Rebien, W. (2002). Empfehlungen zur praktischen Durchführung der spezifischen Immuntherapie mit Allergenen (Hyposensibilisierung). *Allergo Journal*, 11, 331–338.
- Simpson, C. R. & Sheikh, A. (2010). Trends in the epidemiology of asthma in England: a national study of 333,294 patients. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 103 (3), 98–106. doi: 10.1258/jrsm.2009.090348
- Smigielski, K. S., Srivastava, S., Stolley, J. M. & Campbell, D. J. (2014). Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunological Reviews*, 259 (1), 40–59. Zugriff auf <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4083836{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=abstract> doi: 10.1111/imr.12170

- Speckmann, E.-J., Hescheler, J. & Köhling, R. (2008). *Physiologie* (5. Aufl.; E.-J. Speckmann, J. Hescheler & R. Köhling, Hrsg.). URBAN & FISCHER Verlag/ Elsevier GmbH.
- Subbarao, P., Anand, S. S., Becker, a. B., Befus, a. D., Brauer, M., Brook, J. R., Denburg, J. a., HayGlass, K. T., Kobor, M. S., Kollmann, T. R., Kozyrskyj, a. L., Lou, W. Y. W., Mandhane, P. J., Miller, G. E., Moraes, T. J., Pare, P. D., Scott, J. a., Takaro, T. K., Turvey, S. E., Duncan, J. M., Lefebvre, D. L., Sears, M. R., the CHILD Study investigators, O'Byrne, P. M., Martinez, F. D., Raizenne, M. E., Ratjen, F. a., Sly, P. D., von Mutius, E., Sears, M., Subbarao, P., Allen, R., Anand, S., Becker, A., Befus, A., Brauer, M., Brook, J., Chen, E., Cyr, M., Daley, D., Dell, S., Denburg, J., Elliott, S., Grasemann, H., HayGlass, K., Hegele, R., Holness, D., Lou, W., Kobor, M., Kollmann, T., Kozyrskyj, A., Laprise, C., Larche, M., Macri, J., Mandhane, P., Miller, G., Moqbel, R., Moraes, T., Pare, P., Ramsey, C., Ratjen, F., Sandford, A., Scott, J., Scott, J., Silverman, F., Takaro, T., Tang, P., Tebbutt, S., To, T. & Turvey, S. (2015). The Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study: examining developmental origins of allergy and asthma. *Thorax*, thoraxjnl-2015. Zugriff auf <http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thoraxjnl-2015-207246> doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207246
- Sugiyama, D., Nishikawa, H., Maeda, Y., Nishioka, M., Tanemura, a., Katayama, I., Ezoe, S., Kanakura, Y., Sato, E., Fukumori, Y., Karbach, J., Jager, E. & Sakaguchi, S. (2013). Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (44), 17945–17950. Zugriff auf <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1316796110> doi: 10.1073/pnas.1316796110
- Suphioglu, C., Singh, M., Taylor, P., Knox, R., Bellomo, R., Holmes, P. & Puy, R. (1992, mar). Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *The Lancet*, 339 (8793), 569–572. Zugriff auf <http://www.thelancet.com/article/014067369290864Y/fulltext> doi: 10.1016/0140-6736(92)90864-Y
- Tangye, S. G., Avery, D. T., Deenick, E. K. & Hodgkin, P. D. (2003). Intrinsic Differences in the Proliferation of Naive and Memory Human B Cells as a Mechanism for Enhanced Secondary Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 170 (2), 686–694. Zugriff auf <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.2.686> doi: 10.4049/jimmunol.170.2.686
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A. & Kaufman, D. L. (2001, jul).

- Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate Th1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology*, 167 (2), 1081–1089. Zugriff auf <http://www.jimmunol.org/content/167/2/1081.full> doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1081
- Tretter, T. & Lorenz, H.-M. (2010, nov). [Regulatory B cells and their role in maintaining peripheral tolerance]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 69 (9), 813–817. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063830> doi: 10.1007/s00393-010-0713-2
- Tretter, T., Venigalla, R. K. C., Eckstein, V., Saffrich, R., Sertel, S., Ho, A. D. & Lorenz, H.-M. (2008, dec). Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells. *Blood*, 112 (12), 4555–64. Zugriff auf <http://www.bloodjournal.org/content/112/12/4555.abstract> doi: 10.1182/blood-2008-02-140087
- Wahn, U. & Wichmann, H.-E. (2000). *Spezialbericht Allergien: Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Ergebnis eines Forschungsvorhabens gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Bundesministerium für Gesundheit*. Stuttgart: Statistisches Bundesamt. Zugriff auf <https://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc{ }abr{ }test{ }logon?p{ }uid=gast{&}p{ }aid=0{&}p{ }knoten=FID{&}p{ }sprache=D{&}p{ }suchstring=4315>
- Wambre, E., DeLong, J. H., James, E. A., LaFond, R. E., Robinson, D. & Kwok, W. W. (2012, feb). Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129 (2), 544–51, 551.e1–7. doi: 10.1016/j.jaci.2011.08.034
- Weissflog, D., Matthys, H. & Virchow, J. C. (2001, jul). [Epidemiology and costs of bronchial asthma and chronic bronchitis in Germany]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 126 (28-29), 803–8. Zugriff auf <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2001-15705> doi: 10.1055/s-2001-15705
- Wong, K. J., Timbrell, V., Xi, Y., Upham, J. W., Collins, A. M. & Davies, J. M. (2015, apr). IgE+ B cells are scarce, but allergen-specific B cells with a memory phenotype circulate in patients with allergic rhinitis. *Allergy*, 70 (4), 420–8. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556717> doi: 10.1111/all.12563
- Wood, G. S. & Freudenthal, P. S. (1992). CD5 monoclonal antibodies react with human peripheral blood dendritic cells. *The American Journal of Pathology*, 141 (4), 789–795.

- Xystrakis, E., Urry, Z. & Hawrylowicz, C. M. (2007). Regulatory T cell therapy as individualized medicine for asthma and allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 7 (6), 535–41. Zugriff auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989531> doi: 10.1097/ACI.0b013e3282f14d7c
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. (2008). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity*, 28 (5), 639–650. Zugriff auf <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761308001933> doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.017
- Yang, Y., Eid, E., Ghosn, B., Cole, L. E., Obukhanych, T. V. & Sadate-ngatchou, P. (2012). Antigen-specific memory in B-1a and its relationship to natural immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (14), 5388–93. doi: 10.1073/pnas.1121627109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1121627109
- Zhang, M., Zeng, G., Yang, Q., Zhang, J., Zhu, X., Chen, Q., Suthakaran, P., Zhang, Y., Deng, Q., Liu, H., Zhou, B. & Chen, X. (2014, may). Anti-tuberculosis treatment enhances the production of IL-22 through reducing the frequencies of regulatory B cell. *Tuberculosis*, 94 (3), 238–244. doi: 10.1016/j.tube.2013.12.003
- Ziβler, U. (2012). Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum. *Frankfurt (Main), Univ., Diss., 2012.*

Anhang

Kongressbeiträge

- Single cell analysis of lymphocyte subsets in induced sputum of grass-pollen allergic patients with asthma

(Authors: Rothkirch S., Lewitan L., Dietz K., Gürth F., Schmidt-Weber C., Chaker A., Zissler U.M.)

Pittsburgh-Munich Lung Conference
10/2015 Munich

- Influence of lower airways inflammation of regulatory T and B cell populations in grass-pollen allergic rhinitis and asthma patients

(Authors: Zissler U.M., Rothkirch S., Lewitan L., Jakwerth C.A., Gürth F., Schmidt-Weber C.B., Chaker A.M.)

European Academy of Allergy and Clinical Immunology Conference
06/2016 Vienna

Danksagung

Ich danke meiner Familie, Julian Decker, Larissa Lewitan und vor allem meinen beiden Betreuern Adam Chaker und Ulrich Zissler, sowie meinem Doktorvater C. Schmidt-Weber für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit.