



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

# Analyse der Typ 2 Innaten Lymphoid Zellen in allergischer Rhinokonjunktivitis und allergischem Asthma

Josephine Kau

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

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfer\*innen der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 25.07.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2023 angenommen.



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
<u>1.1 Allergische Erkrankungen-Definition und Epidemiologie</u>	<u>12</u>
<u>1.2 Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis- Pathophysiologie und Charakterisierung</u>	<u>14</u>
<u>1.3 Die Bedeutung von Type 2 Innate Lymphoid Cells</u>	<u>18</u>
<u>1.4 Diagnostik und Therapie allergischer Rhinitis und Asthma Bronchiale</u>	<u>24</u>
<b>2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<u>3.1 Materialien</u>	<u>28</u>
<u>3.2 Probanden</u>	<u>33</u>
3.2.1 Ethische Richtlinien	33
3.2.2 Probandenkollektiv	33
<u>3.3 Die Sputumgewinnung und -aufbereitung</u>	<u>35</u>
3.3.1 Sputuminduktion	35
3.3.3 Sputumaufbereitung	37
<u>3.4 Zytospins</u>	<u>39</u>
3.4.1 Herstellung und Färbung	39
3.4.3 Differenzierung der Zellen im Sputum	39
<u>3.5 Gewinnung und Aufbereitung PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)</u>	<u>44</u>
3.5.1 PBMC-Gewinnung	44
3.5.2 PBMC-Aufbereitung	44
3.5.3 Zellzählung der Sputum- und PBMC-Proben	44
<u>3.6 Begleitende Untersuchungen</u>	<u>46</u>
3.6.1 Ablauf	46
<u>3.7 Durchflusszytometrieanalyse (FACS)</u>	<u>48</u>
3.7.1 Durchflusszytometrieanalyse	48
3.7.2 Färbung mit Antikörpern	48
3.7.3 Kompensation	50

3.7.4 Sputum-Panel	51
3.7.5 PBMC-Panel	51
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<u>4.1 Statistische Auswertung</u>	<u>52</u>
<u>4.2 Klinische Daten</u>	<u>53</u>
4.2.1 Sputumqualität	53
4.2.2 Übersicht Klinische Daten	55
4.2.3.1 Vergleich der Gesamt-IgE Werte	56
4.2.3.2 Vergleich des mini Rhinoconjunctivitis Quality of life (mRQLQ) Fragebogens	56
4.2.4 Korrelation mit Lungenfunktionsdaten	58
4.2.5 Gesamtzellzahl im Sputum (Zellen pro mL)	60
4.2.6 Prozentuale Zelldifferenzierung des Sputums in der IN-Season	60
<u>4.3 Durchflusszytometrie</u>	<u>61</u>
4.3.1 Phänotypisierung der ILC2s im Sputum: Lokale Immunantwort	61
4.3.2 Phänotypisierung der ILC2s im Blut (PBMC): Systemische Immunantwort	62
4.3.3 Korrelation zwischen ILC2 und TH2 Zellen im Sputum	63
4.3.4 Sputum Zytokinlevel	64
4.3.5 Intraorgan (Sputum) Korrelation von IL-5 und IL-13	65
4.3.6 Korrelation von IL-5 und IL-13 mit ILC2 im Sputum	66
4.3.7 Sputum-Cell-Load Korrelation mit IL5 und IL13	67
4.3.8 Analyse von PGE2 im Sputum	68
4.3.9 Korrelation von Sputum PGE2 mit ILC2 und IL-13	69
4.3.10 Sputum PGE2 in Korrelation mit Eosinophilen und Sputum Cell Load (Inflammatory Cell Load)	70
<u>4.4 Korrelation mit klinischen Daten</u>	<u>71</u>
4.4.1. Korrelation IgE mit ILC2s-lokal und Systemisch	71
4.4.2 Korrelation mRQLQ mit ILC2s- lokal und Systemisch	72
4.4.3 Korrelation von Sputum PGE2 mit klinischen Daten	73
<b>5. Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>80</b>
<u>7.1. Übersicht klinischer Daten der OFF-Season</u>	<u>80</u>
<u>7.2. Sputum Zelldifferenzierung der OFF-Season</u>	<u>81</u>
<u>7.3. Mini Rhinitis Quality of Life Questionnaire (deutsche Version)</u>	<u>82</u>
<b>8. Publikationen in Peer Review Journals und Kongressbeiträge</b>	<b>84</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>85</b>

## **10. Literaturverzeichnis**

**86**

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>AA</b>	Allergische Asthma
<b>AR</b>	Allergische Rhinitis
<b>AIT</b>	Autoimmuntherapie
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FEV1</b>	Forced Expiratory Pressure in 1 Second = Einsekundenkapazität
<b>HC</b>	Healthy Control
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILC</b>	Innaten Lymphoid Zellen
<b>IN-Season</b>	Zeitraum mit Pollenbelastung
<b>MEF 50</b>	Expiratorische Atemstromstärke bei 50% der Vitalkapazität
<b>MEF25</b>	Expiratorische Atemstromstärke bei 25% der Vitalkapazität
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>NaCL</b>	Natriumchlorid
<b>GINA-Score</b>	Global Strategy for Asthma Management and Prevention-Score
<b>OFF-Season</b>	Zeitraum ohne Pollenbelastung
<b>p</b>	P-value/Wahrscheinlichkeit
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cell = Mono-, Lymphozyten
<b>RAST</b>	Radio-Allergo-Sorbent-Test
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RPM</b>	Revolutions per minute
<b>mRQLQ</b>	Mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire
<b>RR</b>	Blutdruck nach Riva-Rocci

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
<b>SCIT</b>	Subkutane Immuntherapie
<b>SLIT</b>	Sublinguale Immuntherapie
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>SOP</b>	Standard Operating Procedure
<b>TH2</b>	T-Helfer-Zellen Typ 2
<b>VC</b>	Vitalkapazität

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1.0:</b> Darstellung der Lebenszeitprävalenz von Asthma Bronchiale und anderen allergischen Erkrankungen (Basierend auf dem Diagramm von (Langen et al., 2013))	13
<b>Abbildung 1.1:</b> Lebenszeitprävalenz einer allergischen Erkrankung abhängig vom Alter (Basierend auf Langen et al., 2013)	14
<b>Abbildung 1.2:</b> Darstellung der Typ 1 Allergischen Reaktion	15
<b>Abbildung 1.3:</b> Darstellung der angeborenen Immunantwort mit den ILCs und ihrem gegenüber, der erworbenen Immunantwort mit der TH-Zellreihe	18
<b>Abbildung 1.4:</b> Darstellung, basierend auf Cosmo et al., 2017 und Koch et al., 2017, der Aktivierung von ILC2s und ihrer Effektor-Zytokine	19
<b>Abbildung 1.5:</b> Darstellung eines ILC2s inklusive Oberflächenmarker, Zellinteraktionen und Interleukine	21
<b>Abbildung 1.6:</b> Darstellung des Mechanismus einer Immuntherapie	26
<b>Abbildung 3.1:</b> Darstellung des Probandenkollektivs und ihrer Untergruppen	34
<b>Abbildung 3.2:</b> Arbeitsprotokoll der Sputuminduktion (Quelle: Zissler 2012)	35
<b>Abbildung 3.3:</b> Flowchart für Sputumaufbereitung (Quelle: Zissler 2012)	37
<b>Abbildung 3.4:</b> Squamöse Zelle	40
<b>Abbildung 3.5:</b> Alveolarmakrophagen	40
<b>Abbildung 3.6:</b> Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt	41
<b>Abbildung 3.7:</b> Stabkerniger neutrophiler Granulozyt	41
<b>Abbildung 3.8:</b> Eosinophiler Granulozyt	42
<b>Abbildung 3.9:</b> Basophiler Granulozyt	43
<b>Abbildung 3.10:</b> Lymphozyt	43
<b>Abbildung 3.11:</b> Darstellung der Kontrollen als FMOs für die ILC2s	50
<b>Abbildung 3.12:</b> Darstellung der Gating-Strategy für ILCs	51

<b>Abbildung 4.0:</b> Darstellung der mittleren prozentualen Zellverteilung in aufbereitetem Sputum_____	53
<b>Abbildung 4.1:</b> Vergleich des mRQLQ bei gesunden Kontrollen und allergischen Probanden mit und ohne SCIT während der IN-Season_____	56
<b>Abbildung 4.2:</b> Darstellung der Stratifizierung nach Rhinitis und Asthma mit dem mRQLQ_____	57
<b>Abbildung 4.3:</b> Vergleich des mRQLQ's bei Allergikern in der IN- und OFF-Season_____	58
<b>Abbildung 4.4:</b> Zeigt den Vergleich des Tiffeneau-Index in den Verschieden Probandengruppen in der IN-Season_____	59
<b>Abbildung 4.5:</b> Zeigt den Vergleich des Tiffeneau-Index in den Verschieden Probandengruppen in der OFF-Season_____	59
<b>Abbildung 4.6:</b> Phänotypisierung der ILC2s im Sputum in der IN-und der OFF-Season_____	61
<b>Abbildung 4.7:</b> Phänotypisierung ILC2 im Blut in der IN- und OFF-Season_____	62
<b>Abbildung 4.8:</b> Korrelation ILC2 (%) und TH2 (%) Zellen im Sputum_____	63
<b>Abbildung 4.9:</b> IL-5, IL-13 und IL-9 Level im Sputum von Probanden mit Asthma und allergischer Rhinitis mit oder ohne Immuntherapie und gesunden Kontrollen_____	64
<b>Abbildung 4.10:</b> Korrelation IL-5/IL-13 (pg/mL) im Sputum_____	65
<b>Abbildung 4.11:</b> Korrelation Sputum IL-13 (pg/mL) und ILC2 (%)_____	66
<b>Abbildung 4.12:</b> Korrelation Sputum IL-5 (pg/mL) und ILC2 (%)_____	66
<b>Abbildung 4.13:</b> Korrelation Sputum-Cell-Load mit Sputum IL-5 (pg/mL)_____	67
<b>Abbildung 4.14:</b> Korrelation Sputum-Cell-Load mit Sputum IL-13 (pg/mL)_____	67
<b>Abbildung 4.15:</b> PGE2 (pg/ml) im Sputum von Probanden mit Asthma und allergischer Rhinitis mit oder ohne Immuntherapie und gesunden Kontrollen._____	68
<b>Abbildung 4.16:</b> Korrelation von ILC2 und PGE2 im Sputum_____	69
<b>Abbildung 4.17:</b> Vergleich von Sputum IL-13 mit PGE2_____	69
<b>Abbildung 4.18:</b> Sputum PGE2 in Korrelation mit Sputum Eosinophilen_____	70

<b>Abbildung 4.19:</b> Sputum PGE2 in Korrelation mit Sputum Cell Load_____	70
<b>Abbildung 4.20:</b> Korrelation IgE (kU/L) und ILC2 (%) im Blut_____	71
<b>Abbildung 4.21:</b> Korrelation IgE (kU/L) mit ILC2 (%) im Sputum_____	71
<b>Abbildung 4.22:</b> Korrelation mRQLQ Gesamtscore mit Sputum ILC2 (%)_____	72
<b>Abbildung 4.23:</b> Korrelation mRQLQ Gesamtscore mit ILC2 (%) im Blut_____	73
<b>Abbildung 4.24:</b> Korrelation zwischen PGE2 und Total IgE (kU/L)_____	73
<b>Abbildung 4.25:</b> Korrelation zwischen PGE2 und dem mRQLQ Gesamtscore_____	73

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1.1:</b> Kosten allergiebedingter Krankheiten (Wahn, 2000)	13
<b>Tabelle 1.2:</b> Darstellung der Intrazellulärenmarker der ILC2s und ihrer Funktion	20
<b>Tabelle 1.3:</b> Darstellung der Oberflächenmarker der ILC2s und ihrer Funktion	22
<b>Tabelle 3.1:</b> Verbrauchsmaterialien	28
<b>Tabelle 3.2:</b> Reagenzien	30
<b>Tabelle 3.3:</b> Geräteliste	31
<b>Tabelle 3.4:</b> Antikörper	32
<b>Tabelle 3.5:</b> Darstellung der Antikörper und Isotypen die für die Durchflusszytometrie verwendet wurden	49
<b>Tabelle 4.1:</b> Übersicht Klinischer Daten und Sputum Zelldifferenzierung IN-Season (Mean +/- SEM)	55
<b>Tabelle 4.2:</b> Sputum Zytokinlevel (Mean +/- SEM)	64

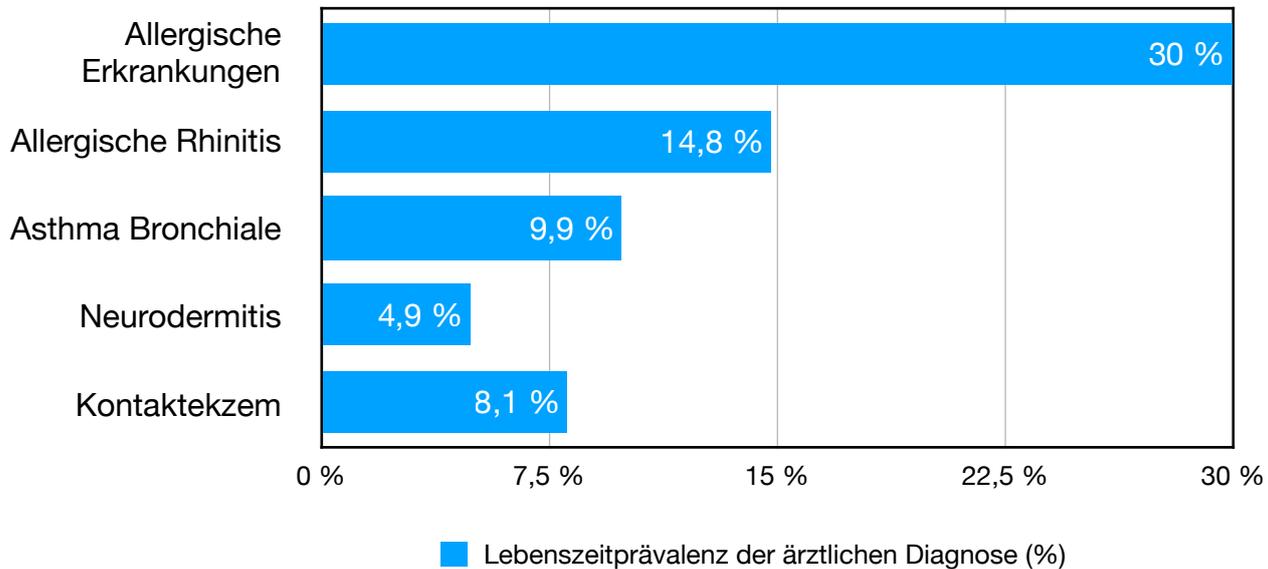
## **1. Einleitung**

### **1.1 Allergische Erkrankungen-Definition und Epidemiologie**

Asthma, atopisches Ekzem, allergische Rhinitis und Nahrungsmittelunverträglichkeiten werden typischerweise in dem Formenkreis der allergischen Erkrankungen oder Atopien zusammengefasst. Sie basieren alle auf der Überreaktion des Körpers gegen Allergene. Allergische Rhinitis und allergisches Asthma verbindet aber noch mehr. Sie werden als United Airways Disease (UAD) beschrieben, um den gemeinsamen Entzündungsprozess besser zu beschreiben (Licari et al., 2014). Sie teilen makroskopisch pathologische Charakteristika, ein ähnliches histologisches Aussehen, die gleiche allergische Immunantwort und koexistierende Symptome (Caffarelli et al., 2018). Die Interaktion zwischen Nase und Lunge ist ein bidirektionaler Prozess und es wurde bereits nachgewiesen, dass die Behandlung der allergischen Rhinitis auch Symptome des Asthma lindern kann (Licari et al., 2014).

Allergien werden wegen „ihrer Häufigkeit und ihrer hohen sozioökonomischen Bedeutung für die Betroffenen und das Gesundheitssystem zu Recht als „Volkskrankheit“ bezeichnet“ (Ring et al., 2010 vgl. S.151). Nach der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell“ (GEDA 2014/2015) geht man davon aus das etwa ein Drittel der Erwachsenen zwischen 18 und 79 Jahren an einer allergischen Erkrankung leidet (Schmitz et al., 2017). Die Prävalenz von Asthma Bronchiale stieg in den vergangenen Jahren um drei Prozentpunkte von von 5,7 % auf 8,6% (Langen et al., 2013). Die Zunahme der allergischen Erkrankungen wird auf den „westlichen Lebensstil“ zurückgeführt. Dieser beinhaltet einen verminderte Exposition gegenüber Mikroorganismen, Rückgang der parasitären Erkrankungen, eine erhöhte Exposition zu Allergenen, Umweltverschmutzung und Veränderung der Darmflora. Hinzu kommen veränderte Ernährungs-, Reise- und Wohngewohnheiten (Graham-Rowe, 2011 vgl. S2-4). Die Epidemiologisch höhere Prävalenz bei Frauen und bei Angehörigen der oberen Bildungsgruppe lässt sich wahrscheinlich auf die konsequentere Einhaltung des Lebensstils zurückführen (Clough, 2011).

### Lebenszeitprävalenz von Allergischen Erkrankungen in Deutschland



*Abbildung 1.0: Darstellung der Lebenszeitprävalenz von Asthma Bronchiale und anderen allergischen Erkrankungen (Basierend auf dem Diagramm von (Langen et al., 2013))*

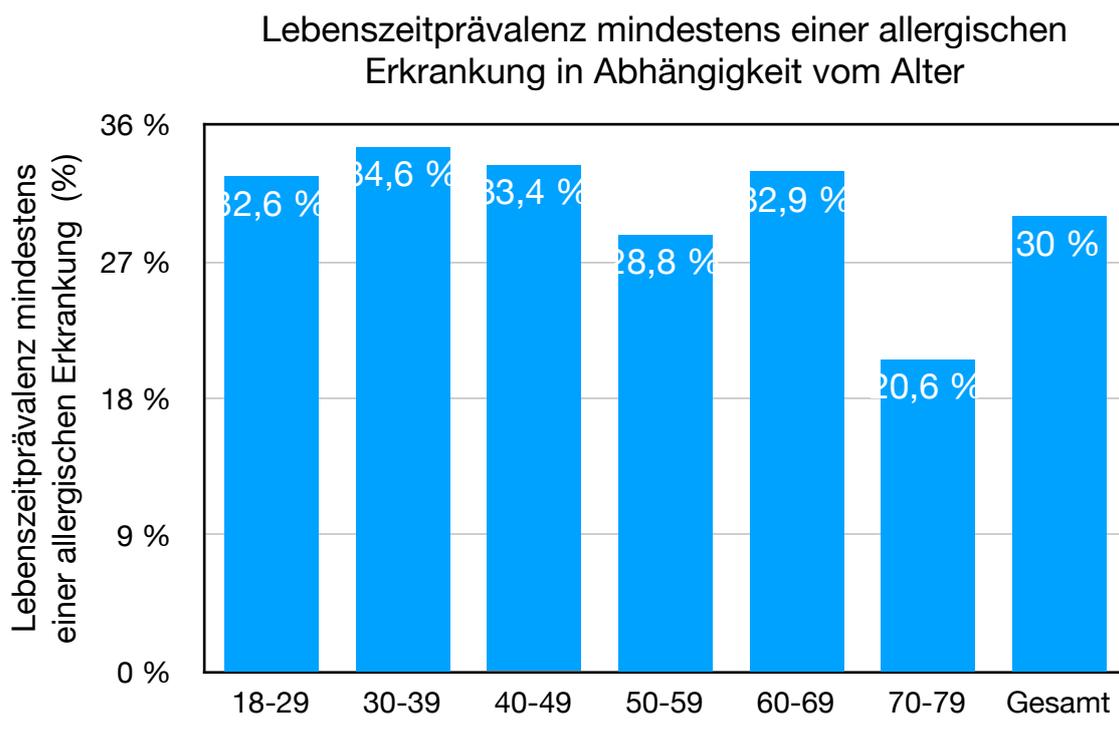
Allergische Erkrankungen haben eine hohe Relevanz für das Gesundheitssystem. Die Kosten für das Gesundheitssystem und die Einschränkung der Lebensqualität sind gekennzeichnet durch häufige Fehlzeiten, dauerhafte Medikation und wiederkehrende Arztbesuche. Die ökonomische Bedeutung für jedes nationale Gesundheitssystem legt die Notwendigkeit nahe diese weiter zu erforschen um eine angemessene Diagnostik, frühzeitige Erkennung der Erkrankung und eine adäquate Versorgung zu ermöglichen (Ring et al., 2010, Schmitz et al., 2017).

Tabelle 1.1 Kosten allergiebedingter Krankheiten (Wahn, 2000)

Kostenart	Kostenelemente	
<b>Direkte Kosten</b>	Ambulante Behandlungen	Stationäre Behandlungen: - Krankenhausaufenthalt - Rehabilitationen/ Kuren
<b>Indirekte Kosten</b>	Vorzeitige Todesfälle	Vorzeitige Berentung und Berufsunfähigkeit
	Arbeitsunfähigkeit (Fehltage)	

## 1.2 Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis-Pathophysiologie und Charakterisierung

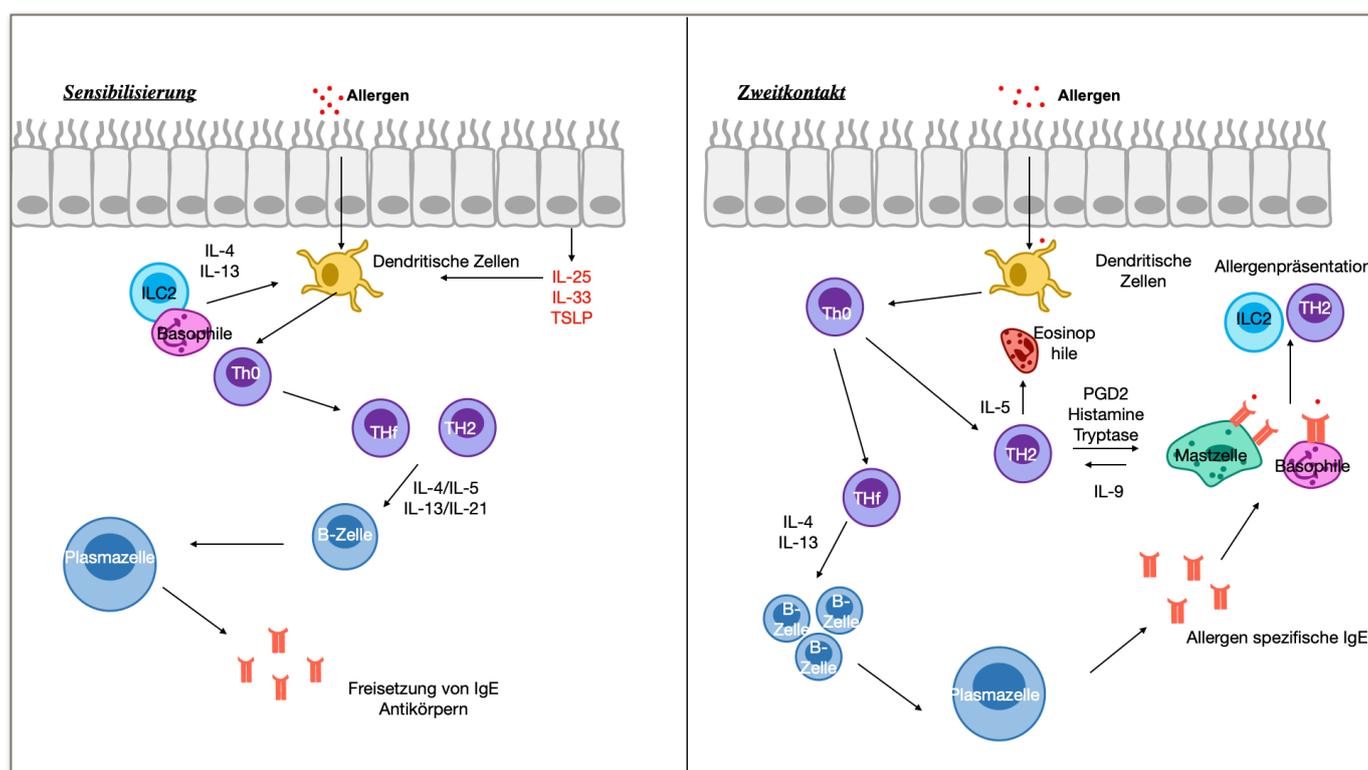
Allergische Rhinokonjunktivitis und allergisches Asthma sind chronisch entzündliche Erkrankungen, bei denen eine Vielzahl an Mediatoren eine Rolle spielen. Gemeinsam ist beiden die Überreaktion des Körpers auf eine Fremdschubstanz (Allergen), die vom Körper normalerweise nicht als pathogen erkannt wird. Zu diesen Allergenen gehören Hausstaubmilben, Tierhaarepithelien und saisonale Pollen. Die häufigsten Aeroallergene in Deutschland sind Gräser- und Birkenpollen (Haftenberger et al., 2013). Eine höhere Prävalenz an Sensibilisierung gegenüber Gräserpollen zeigt sich im jungen Erwachsenenalter und nimmt ab dem 50. Lebensjahr ab (Langen et al., 2013). Wegen der hohen Prävalenz und klinischen Relevanz konzentrierten wir uns daher auf Probanden mit Gräserpollenallergie.



**Abbildung 1.1:** Lebenszeitprävalenz einer allergischen Erkrankung abhängig vom Alter (Basierend auf Langen et al., 2013)

Gräserpollen führen bei Allergikern zu einer Entzündung der Nasen- und Konjunktivalenschleimhaut. Die typischen Symptome sind eine juckende Nase mit vermehrter Sekretion, Behinderung der Nasenatmung, vermehrter Niesreiz und gerötete, juckende Augen. Das

Allgemeinbefinden der Betroffenen ist stark beeinträchtigt. Die Gräserpollen dringen über Diffusion in die Schleimhautoberfläche ein und lösen hier eine allergische Typ 1 Reaktion vom Soforttyp aus. Die IgE vermittelte Reaktion richtet sich gegen Oberflächenbestandteile der Allergene und ist auf Mastzellen und basophilen Leukozyten Zellen verankert (Heppt et al., 2013 vgl. S. 29-31). Diese setzen an den Zielorganen (Nase, Augen und Lunge) Histamin sowie andere Mediatoren frei. Die Folge sind die typischen Symptomen der Allergischen Rhinokonjunktivitis. Diese Reaktion ist Folge zellulärer pathophysiologischer Interaktionen (Abbildung 1.2). In der Sensibilisierungsphase, wird das Allergen von Antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen oder Dendritischen Zellen) den TH2 -Zellen präsentiert. Diese, jetzt spezifischen TH-2 Zellen, regen B-Zellen an spezifische IgEs zu produzieren. Es folgt eine Bindung an hoch-affine Rezeptoren der Mastzellen und Basophilen Granulozyten. Kommt es zu einem erneuten Allergenkontakt findet direkt eine Kreuzvernetzung der Mastzellen und Basophilen sowie eine Degranulation der gespeicherten Entzündungsmediatoren statt. Die typischen Symptome der allergischen Rhinokonjunktivitis werden von diesen Entzündungsmediatoren (Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen) ausgelöst (Heppt et al., 2013 vgl. S.29-31).



**Abbildung 1.2:** Darstellung einer Typ 1 allergischen Reaktion. Zu erst kommt eine Sensibilisierung bei dem das Allergen den Th2-Zellen präsentiert wird. Diese regen wiederum die B-Zellen an spezifische IgEs zu bilden. Die IgE Antikörper binden an den Mastzellen und Basophilen. Es kommt zur Mastzelldegranulation. Beim Zweitkontakt binden die Allergene direkt an den Mastzellen, es kommt zur Degranulation der Entzündungsmediatoren und somit zur allergischen Reaktion.

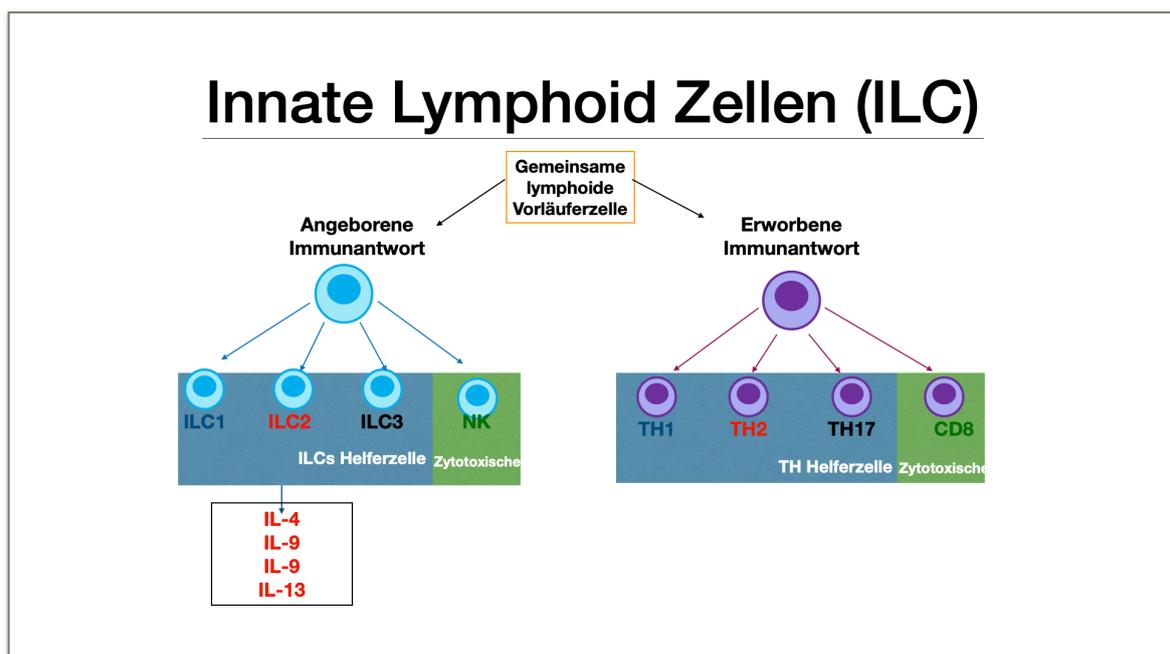
Es gibt zwei Formen des Asthma Bronchiale. Zum einen die intrinsische Form des Asthmas, die z.B. von Medikamenten, Infektionen oder chemischen Noxen ausgelöst wird und zum anderen das allergische (atopische) Asthma. Die Mehrzahl der Patienten leidet an allergischem Asthma Bronchiale, welches sich oft zum ersten mal im Kindes- oder Jugendalter äußert. Die allergische Rhinokonjunktivitis ist häufig eine Vorstufe des allergischen Asthma Bronchiale. Man spricht dann von einem so genannten „Etagenwechsel“. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass 70% der Asthma Patienten auch an einer Allergischen Rhinitis leiden (Bachert et al., 2005 vgl. S.24). Persistierendes allergisches Asthma kann eine zunehmende nicht-allergische Komponente entwickeln. Dies zeigt sich dann in einer Symptomatik, die unabhängig vom Allergenkontakt auftritt und persistieren kann (Bachert et al., 2005 vgl.S.24). Ähnlich wie bei der allergischen Rhinokonjunktivitis, spielt beim allergischen Asthma die Typ-I Reaktion (Soforttyp) die entscheidende Rolle. Die Erkrankten neigen zur Bildung von IgE Antikörpern gegen Allergene (Heppert and Bachert, 2010 vgl.S.35). Nach einer Sensibilisierungsphase führen auch hier Mastzelledegranulation und Histaminfreisetzung zu den Krankheitssymptomen. Bei allen Formen des Asthmas kommt es zu einer chronischen bronchialen Entzündung die, die typischen asthmatischen Symptome verursacht (Heppert and Bachert, 2010 vgl.S.35). Diese Symptome sind eine „Atemwegs (Hyper-) reaktivität die zu wiederkehrenden Episoden von Giemen, Atemnot, Brustenge und Husten führt, insbesondere Nachts oder am frühen Morgen“ (GINA 2016).

Beim Asthma ist die Bronchialschleimhaut mit Eosinophilen, Mastzellen und aktivierten Lymphozyten infiltriert. Die reversible Bronchokonstriktion wird vor allem durch Mastzellen und dem freigesetzten Histamin und Leukotriene ausgelöst (Heppert and Bachert, 2010 vgl. S.35). Die Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen setzen weitere Zytokine frei. Diese sind verantwortlich für die Eosinophilie und weitere wichtige Komponenten der Asthmatischen Entzündung (Heppert and Bachert, 2010 vgl. S.35). Die aktivierten Lymphozyten können über die Freisetzung von IL-4 und IL-13 die Bildung von IgE, durch B-Lymphozyten stimulieren, und steuern über weitere Chemoattraktoren (IL-5, GM-CSF) und IL-3 die Einwanderung sowie Überlebensdauer der eosinophilen Granulozyten (Bachert et al., 2005 vgl. S.10). Eosinophile Granulozyten produzieren zytotoxische Produkte die das Atemwegsepithel schädigen und bronchokonstriktorische Mediatoren bilden (Heppert and Bachert, 2010 vgl. S. 35). Daher spielen eosinophile Granulozyten wegen ihrer Fähigkeit, verschiedene Zytokine zu bilden und Mediatoren/Leukotriene freizusetzen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Asthma bronchiale. Sie sind bei Asthmatikern im Blut, im Sputum und in Schleimhautbiopsien erhöht nachweisbar (Bachert et

al., 2005 vgl. S.10). IL-13 wird mit einer Fibrosierung der Atemwege assoziiert (Heppt and Bachert, 2010 vgl. S.35). Je nach Ausprägung und Dauer der bronchialen Entzündung kommt es zu einem Atemwegs-Remodeling. Darunter versteht man mehrere persistierende Schleimhautveränderungen, die aus der zunächst reversiblen Atemwegsobstruktion eine persistierende, therapierefraktäre Obstruktion entstehen lässt (Bachert et al., 2005 vgl. S.10-11). Es kommt vor allem zu einer subepithelialen Fibrose, Becherzell-Hyperplasie und Hyperplasie der glatten Muskulatur.

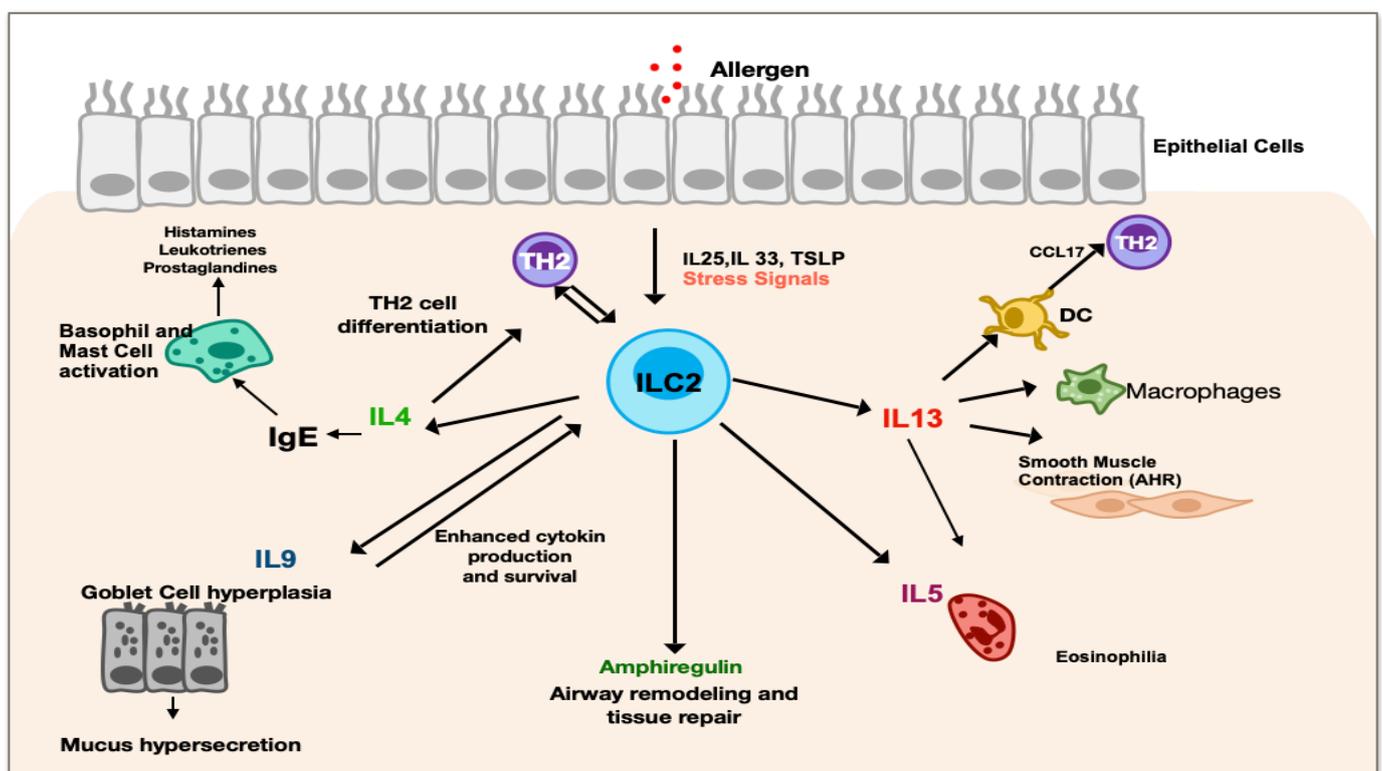
### 1.3 Die Bedeutung von Type 2 Innate Lymphoid Cells

Die exakten pathophysiologischen Mechanismen der allergischen Rhinitis und allergischem Asthma sind jedoch noch nicht im Detail geklärt. Zunächst waren lediglich die Freisetzung der Typ-2 Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-13 und IL-9 durch CD4+ TH2 Zellen beschrieben. In neueren Studien wird nun weiteren Zellgruppen eine wichtige Rolle im Pathomechanismus zugeschrieben. So konzentrierte sich die Aufmerksamkeit in den letzten Jahren auf die Innaten Lymphoid Zellen (ILCs). ILCs sind teil der angeborenen Immunantwort und haben keine spezifischen Antigenrezeptoren. Sie reagieren auf Stresssignale, „Alarmine“, von Mukosa-Stammzellen Dendritischen Zellen oder Makrophagen. Stresssignale werden vermittelt durch Zytokine, Oberflächenrezeptoren und Lipidmediatoren, deren Ausschüttung durch Allergene oder Mikroorganismen stimuliert werden (Mjösberg and Eidsmo, 2014). Die ILCs werden aufgrund ihrer Stellung im Reaktionsablauf als Wächter oder „sentinels“ der ersten Immunantwort beschrieben (Halim et al., 2016). Charakterisiert durch ihre Produzierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren unterscheiden sich drei Arten von ILCs (ILC1, ILC2 und ILC3) (Mjosberg and Spits, 2016). Alle stammen von der gleichen lymphoiden Vorläuferzelle der angeborenen Immunantwort ab (Scoville et al., 2019). ILCs sind das angeborene Gegenstück zu den T-Lymphozyten. Sie sind ein Spiegelbild der erworbenen Immunantwort durch die T-Lymphozyten TH1, TH2 und TH17 (Kato, 2019).



**Abbildung 1.3:** Darstellung der angeborenen Immunantwort mit den ILCs und ihrem gegenüber, der erworbenen Immunantwort mit der TH-Zellreihe.

Dem Typ-2 dieser Innaten Lymphoid Zellen wird eine wichtige Rolle in der Abwehr von Parasiten und in der Pathogenese von allergischen Reaktionen zugesprochen. ILC2s wurden zuerst in Mäusen als IL-13-produzierende Lymphozyten beschrieben und später auch in menschlichem Gewebe nachgewiesen (Mjösberg and Eidsmo, 2014). Sie finden sich im Darm, der Haut, der Lunge und in nasalem Gewebe. Wie auch TH2 Zellen benötigen sie für ihre Entwicklung und Erhaltung im Körper den Transkriptionsfaktor GATA 3. GATA 3 reguliert eine Reihe von Genen die für die Funktionsausübung beider Zellreihen ausschlaggebend sind. Dies könnte eine Erklärung für die ähnliche Funktionen der Th2 und ILC2 Zellen sein (Zhu, 2017).



**Abbildung 1.4:** Darstellung, basierend auf Cosmo et al., 2017 und Koch et al., 2017, der Aktivierung von ILC2s und ihrer Effektor-Zytokine. Nach dem Allergenkontakt kommt es zur Ausschüttung der „Alarmine“ (IL25, IL33, TSLP). Dies wiederum löst die Ausschüttung der Zytokine IL13, IL5, IL9 und IL4 aus. Nach ihrer Aktivierung durch Allergene leiten die ILC2s eine allergische Reaktion ein, in dem sie die adaptive sowie die angeborene Immunantwort stimulieren (Cosmi et al., 2017).

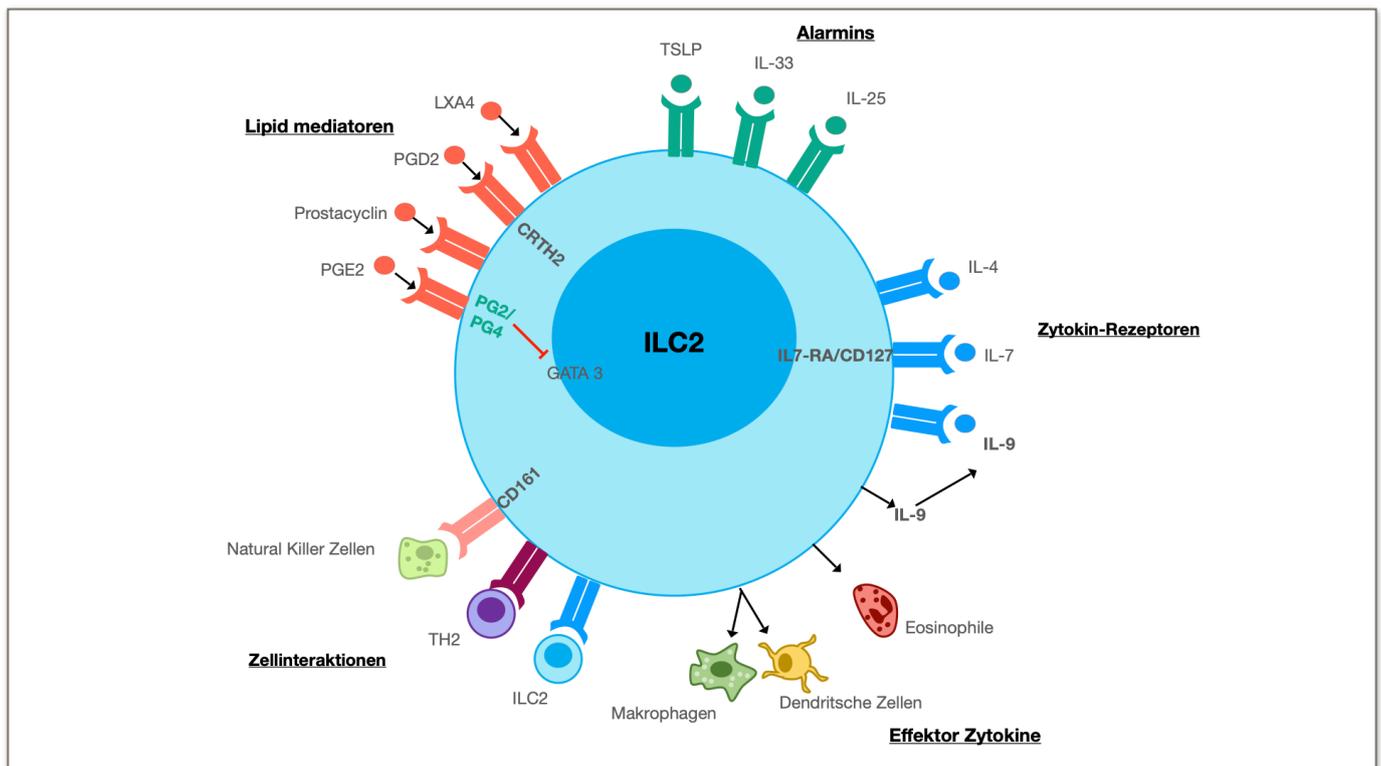
Die ILC2 setzen ein ähnliches Spektrum an Zytokinen wie die TH2 Zellen frei. Diese Effektor-Zytokine ermöglichen es dann beiden Zelltypen auf die spezifische Immunantwort einzuwirken (Zhu, 2017). Die Sekretion der Typ-2 Zytokine, IL-4, IL-5, IL-13 und IL-9, erfolgt als Antwort auf

„Alarmine“ (IL-25, IL-33 und TSLP) (Abb.1.5) und somit nehmen die ILC2s direkt am Entzündungsprozess teil (Mazzurana et al., 2018)(Zissler et al., 2016, Maggi et al., 2017). Es ist den ILC2s möglich ihre Effektor-Zytokine auch dann auszuschütten wenn keine TH2 Zellen vorhanden sind. Der Fokus dieser Studie richtet sich auf Drei dieser Effektor-Zytokine (IL5, IL9 und IL13) (Abbildung 1.4). Über IL-5 ist es den ILC2s möglich eosinophile Granulozyten aus dem Knochenmark zu aktivieren und ihre Überlebenszeit zu verlängern (Wechsler et al., 2012). So kann es dann im Rahmen einer allergischen Reaktion zu einer Eosinophilie kommen. Durch IL9 wird vermehrt Mukus produziert, eine Kontraktion der glatten Muskulatur verursacht und eine Hyperplasie der Becherzellen angestoßen. Hinzukommt, dass durch IL9 vermehrt IL5 und IL13 durch die ILC2s produziert werden (Koch et al., 2017). Turner et al. 2013 konnten zeigen das IL9 ein wichtiger autokriner Überlebensfaktor für die ILC2s darstellt und somit ihre Funktion und Überleben verbessert (Turner et al., 2013). Dies sind typische Pathologien des Asthma Bronchiale (Neurath and Finotto, 2016). Um TH2 Zellen für die adaptive Immunantwort, Makrophagen und Dendritische Zellen zu rekrutieren wird von den ILC2s IL13 freigesetzt (Maggi et al., 2017). Die TH2 Zellen werden mittels des Chemoattraktant CCL17 über die dendritischen Zellen rekrutiert (Halim et al., 2016). Die ILC2s werden als Hauptproduzenten von IL13 beschrieben (Halim et al., 2016).

Tabelle 1.2: Intrazelluläre Marker der ILC2s und ihrer Funktion

Intrazelluläre Marker	Funktion
<b>IL5</b>	Nach Aktivierung der ILC2 wird die Eosinophilproduktion durch IL5 erhöht (Konya and Mjosberg, 2016) in dem mehr eosinophile aus dem Knochenmark ausgeschüttet werden und Apoptose inhibiert wird (Wechsler et al., 2012).
<b>IL9</b>	Wird von ILC2s exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Allergischer Rhinitis und Asthma (Neurath and Finotto, 2016) durch Mukusproduktion und Goblet Zellen Hyperplasie. Des weiteren ist IL9 ein autokriner Überlebens Faktor in dem es die Produktion von IL13 und IL15 induziert und somit die Funktion verstärkt (Turner et al. 2013)
<b>IL13</b>	Die ILC2s sind die Hauptproduzenten von IL13 und rekrutieren hiermit über dendritische Zellen mittels dem Chemoattraktant CCL17 die Th2 Zellen (Halim et al., 2016).

Als Teil der Zellulären Reparaturantwort setzen ILC2s Amphiregulin (AREG) frei das an der Gewebereparatur der Lunge teilnimmt und die Lungenfunktion verbessert. ILC2s haben somit zweierlei Funktionen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Gewebekrankheiten und auch in der Gewebereparatur (Doherty and Broide, 2015).



**Abbildung 1.5:** Darstellung eines ILC2s inklusive Oberflächenmarker, Zellinteraktionen und Interleukine. Dargestellt werden auch die Marker und ihre Funktion, die für die Typisierung von ILC2s benutzt wurden (CRTH2 - ein Prostaglandin D2 Rezeptor, IL7-RA/CD-127 - IL7 Zytokin-Rezeptor und CD-161 - NK-Zellrezeptor) (Cosmi et al., 2000) (Chackerian et al., 2007) (Doherty and Broide, 2015). Dargestellt wird auch die regulatorische Funktion des PGE2s über die PG2- und PG4- Rezeptoren und somit Inhibierung von GATA 3 (Maric et al. 2018).

Auf ILC2s werden verschiedene Oberflächenmarker exprimiert, die für ihre Identifikation genutzt werden können (Abbildung 1.5). Den ILC2s fehlen die klassischen Oberflächenmarker, die beispielsweise von B-, T- und NK-Zellen exprimiert werden. Stattdessen lässt sich der CD45 Panleukozyten Marker und ein CRTH2 (Chemokin Rezeptor Molekül), ein Prostaglandin D2 Rezeptor, der auch auf TH2 Zellen zu finden ist nachweisen (Doherty and Broide, 2015) (Cosmi et

al., 2000, Trabanelli et al., 2018). Darüber hinaus exprimieren die ILC2s die NK-Zellrezeptoren CD161 und ST2. Letzterer ist Teil des IL13 Rezeptorkomplexes (Chackerian et al., 2007, Cosmi et al., 2017). Die Zytokinrezeptoren IL-2RA und IL7RA (CD-127) sind in die Entwicklung und Aktivierung der ILC2s eingebunden (Cosmi et al., 2017). Alle diese Oberflächenmarker können in verschiedenen Kombinationen zur Identifizierung der ILC2s herangezogen werden. In der aktuellen Studienlage werden menschliche ILC2s als Lineage negative und CD45, CD127, CRTH2 und CD161 positive Zellen betrachtet (Mjösberg and Eidsmo, 2014).

Tabelle 1.3- Darstellung der Oberflächenmarker und ihrer Funktion

Oberflächenmarker	Funktion
<b>Lineage</b> ( <b>CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, und CD56</b> )	Bekannte Surface Marker auf T-, B- and NK Zellen die nicht von ILC2 exprimiert werden (Doherty et al., 2014)
<b>CD45</b>	Pan-Leukozytenmarker
<b>CD161</b>	Natural Killer Zellen-Rezeptor (Bal et al., 2016)
<b>IL7-RA</b>	IL7 Zytokin-Rezeptor (Bal et al. 2016)
<b>CRTH2</b>	Prostaglandin Rezeptor auf ILC2s sowie Basophilen und Mastzellen (Trabanelli et al., 2018)
<b>CD84</b>	Ein CD2 Signalisierendes Molekül das eine Rolle im T-Zell-B-Zell Kontakt spielt (Doherty et al., 2014)
<b>CD154</b>	ILC2 Zellen exprimieren Toll-like-Rezeptors. Diese können die Expressierung von CD154 auslösen und somit die IgE Produktion stimulieren (Maggi et al., 2017)
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2 (PGE2), ein aktiver biolipid, wird von Maric et al. (2018) als Regulator der ILC2s beschrieben.

Prostaglandin E2 (PGE2), ein Metabolit der oberen Atemwege, übt je nach Gewebe und Umgebungsbedingungen eine pro- oder anti-inflammatorische Wirkung über seine vier Rezeptoren (EP1-EP4) aus. Es wird vom Epithel und den glatten Muskelzellen freigesetzt (Sastre and del Pozo, 2012). PGE2 wird als aktives Biolipid und als Regulator der ILC2s beschrieben (Maric et al., 2018). Es wird in der aktuellen Studienlage vermutet das PGE2 die GATA3 Expression inhibiert und somit

auch die Produktion der Typ 2 Zytokine (IL5 und IL13) über die E-Typ Prostanoid-Rezeptoren (EP2 und EP4) reduziert, die auf den ILC2s vorhanden sind ( Abbildung 1.5) (Maric et al., 2018). Der Effekt von Prostaglandin E2 über den EP3 Rezeptor ist noch nicht ausreichend analysiert

## 1.4 Diagnostik und Therapie allergischer Rhinitis und Asthma Bronchiale

Die Diagnostik der Typ 1 Allergien beginnt mit einer ausführlichen Anamnese, bei der die relevanten Symptome und die Zeitintervalle in denen sie auftreten dokumentiert wird. Im Skin-Prick-Test werden fragliche Antigene sowie obligat negative (NaCl) und obligat positive (Histamin) Kontrollantigene auf die Haut aufgetragen und anschliessend mit einer Lanzette leicht angestochen. Bei einer Sensibilisierung auf ein bestimmtes Antigen wäre nach 20 Minuten eine Quaddel sichtbar und diese wird abgemessen. Bei positivem Befund kann das Gesamt-IgE und die allergenspezifischen IgE-Antikörper im Serum durch eine ImmunoCAP Untersuchung bestimmt und in ihrer klinischen Bedeutung eingeteilt werden.

Zusätzlich zu der Anamnese und allergologischen Stufendiagnostik ist beim Asthma Bronchiale die Bestimmung der Lungenfunktion von Bedeutung. Während der Lungenfunktion mit einem Spirometer ist auf den verringerten FEV1 (Einsekundenkapazität) und Tiffeneau-Index zu achten. Die Einsekundenkapazität repräsentiert das Volumen, das der Patient nach maximaler Einatmung innerhalb einer Sekunde maximal ausatmen kann. Der Tiffeneau-Index beschreibt den prozentualen Anteil des FEV1 Wertes in Relation zur Forcierten Vitalkapazität (FEV1/FVK) und sollte mehr als 0.7 oder 70% sein. Beim Asthma Bronchiale ist der Strömungswiderstand der Atemwege erhöht und führt dazu, dass weniger Volumen ausgeatmet werden kann bzw. zu einem erniedrigten FEV1 und Tiffeneau-Index. Zusätzlich wird in der Spirometrie ein Bronchospasmodolysetest durchgeführt um die Reversibilität der Obstruktion des Asthma Bronchiales mit Bronchodilatoren zu zeigen. Auch hier wird vor und 10 Minuten nach Broncholyse der FEV1-Wert gemessen. Ein Anstieg des FEV1 um 200ml und ca. 12 % des Ausgangswertes lässt auf eine reversible Atemwegsobstruktion schliessen.

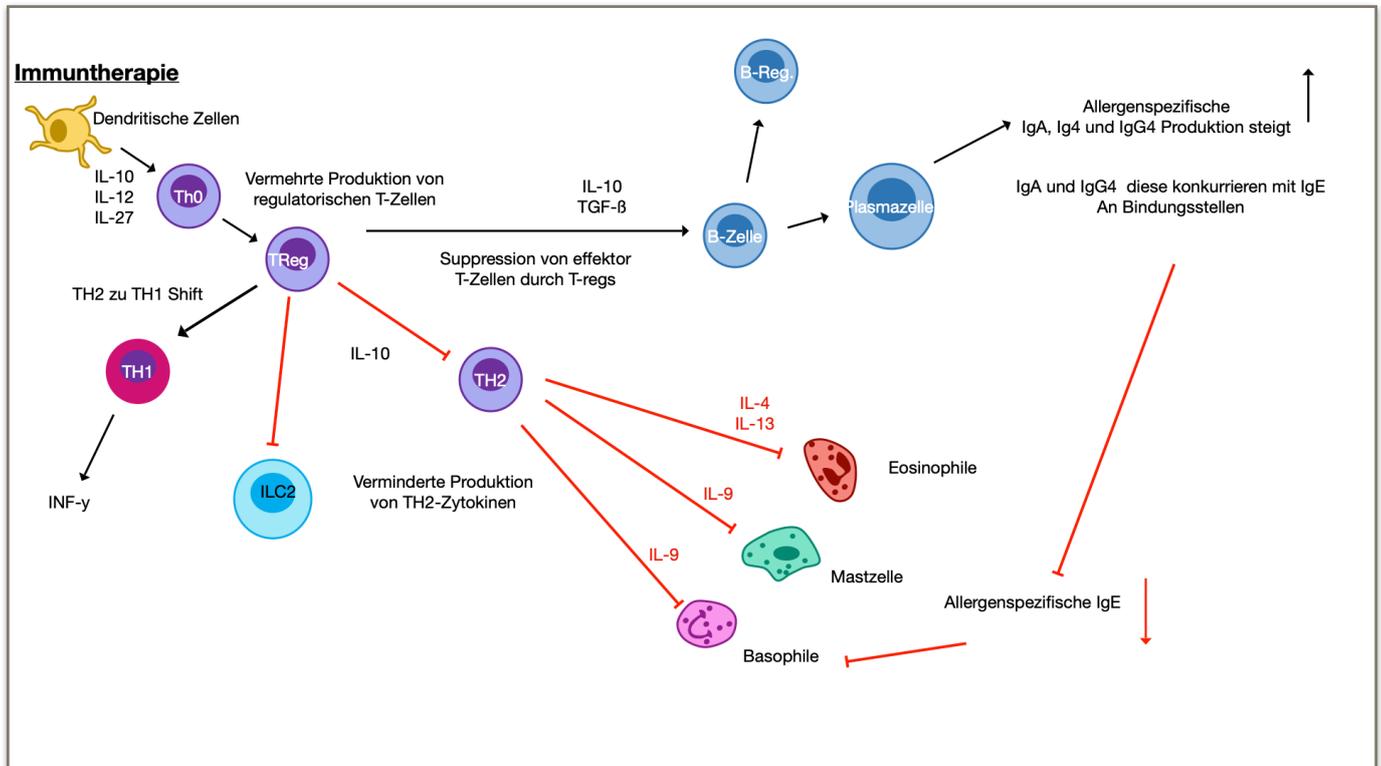
Zu den Therapeutischen Massnahmen gehören kausale und symptomatische Therapiemöglichkeiten. Die symptomatischen Therapiemöglichkeiten bei der allergischen Rhinokonjunktivitis sind Nasensprays (mit Xylometazolin, Antihistaminikum oder Glucocorticoiden), Augentropfen und orale Antihistaminika. Beim Asthma Bronchiale werden kurz- oder langwirksame Bronchodilatoren, wie zum Beispiel Salbutamol oder inhalative Glucocorticoide eingesetzt. Systemische Glucocorticoide werden wegen ihrer Breite an Nebenwirkungen (z.B. Osteoporose, Stammfettsucht und psychische Veränderungen) nur in schweren Fällen oder nur über einen kurzen

Zeitraum eingesetzt. Einige Patienten sprechen auch nicht auf hoch-dosierte Glucocorticoide an. Im Vergleich zu TH2 Zellen weisen die ILC2 eine verminderte Steroidsensitivität auf und könnten somit eine wichtige Rolle in glucocorticoid-resistentem Asthma spielen (Jia et al., 2016). Yu et al. 2018 konnten andererseits zeigen das eine Glucocorticoidtherapie zu einer Verringerung der ILC2s und ihrer Zytokine sowie eine Besserung der Symptomatik führt (Yu et al., 2018).

Vor dem Hintergrund der starken Nebenwirkungen von Glucocorticoiden sind die kausalen Therapiemöglichkeiten und ihre Wirksamkeit bedeutungsvoll. Kausale Therapiemöglichkeiten sind die Allergenkarenz und eine spezifische Immuntherapie, in subkutaner (SCIT) oder sublingualer (SLIT) Form. Die Allergenkarenz ist oft nur schwer im Alltag umzusetzen. Die Allergen spezifische Immuntherapie ist eine anti-inflammatorische, kausale als auch präventive Form der Therapie für allergische Erkrankungen (Jacobsen, 2001). Bei den beiden Formen der Immuntherapie werden über mehrere Jahre Dosen des entsprechenden Allergens verabreicht. Der Erfolg einer Immuntherapie basiert auf mehreren immunologischen Mechanismen. Zum einen wird die saisonale Zunahme der Eosinophilen unterdrückt und es wird eine Verschiebung von TH2-Zellen zu TH1 Zellen eingeleitet und erhalten (Jacobsen et al., 2012). Durch die Stimulation werden vermehrt regulatorische T-Zellen produziert, die wiederum schütten ein anti-inflammatorisches Zytokin (IL10) aus und können damit die TH2 kontrollierte Immunantwort regulieren (van der Valk et al., 2015). Dadurch wird die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen blockiert (Moote et al., 2018). Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Produktion von IgG, vor allem IgG4 Antikörpern (Jacobsen et al., 2012). Diese führen zu einer Verminderung der allergischen Symptome in dem sie mit IgE Antikörpern an Bindungsstellen konkurrieren und es zu einer Verringerung von antigenspezifischem IgE kommt (Shamji and Durham, 2017).

In mehreren Studien wurde die Wirksamkeit von SCIT/SLIT untersucht. Die Vorteile sowie die klinischen Auswirkungen einer Immuntherapie sind ein Rückgang der allergischen Symptome, der Gebrauch von Medikamenten sowie Prävention (Jacobsen et al., 2012). Bei Patientin mit saisonal allergischer Rhinitis die 3 Jahre immuntherapiert wurden, konnten ein positives klinisches Bild über mehrere Jahre nach Abschluss der Therapie nachgewiesen werden (Eng et al., 2006). Eine Cochrane Review fand, dass eine Immuntherapie (SCIT/SLIT) wirkungsvoll Asthmasymptome lindert und den Gebrauch von symptomatischer Medikationen reduziert (Abramson et al., 2010). Wichtig ist auch der vergleich zwischen SLIT und SCIT als Therapiemöglichkeit. Wenn auch die Immuntherapie in ihrer Wirksamkeit nachgewiesen ist unterziehen sich jedoch nur 7% der

erkrankten einer dieser spezifischen Therapien (Biermann et al., 2013). Häufig wird Kortison zur Linderung der Symptomatik eingesetzt.



**Abbildung 1.6:** Darstellung der Wirkung einer Immuntherapie. Es werden vermehrt regulatorische T-Zellen gebildet die zum einen über IL-10 B-Zellen stimulieren IgA und IgG4 zu produzieren und zum anderen effektor T-Zellen supprimieren. Hinzukommt ein Shift von TH2- zu TH1- Zellen. Dies führt zu einer verminderten Produktion von TH2 Zytokinen und somit Verminderung der Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen. Basierend auf der Darstellung von van der Valk et al., 2015 und Shamji et al. 2017.

## **2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Den ILC2s wurde in den letzten Jahren eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von allergischer Rhinitis und allergischem Asthma zugeschrieben. Vor allem durch ihre Effektor-Funktion in der Manifestation von Atemwegsentzündungen über die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 und ihrer Fähigkeit die Aktivität von Immunzellen zu fördern (Mjösberg and Eidsmo, 2014). Bisher wurden vor allem ihre mechanistische Rolle beschrieben. Ihre klinische Relevanz wurde noch nicht ausführlich analysiert. Um die Darstellung und Quantifizierung von ILC2s zu erreichen wurden Oberflächen- und Intrazellulärmarker ausgesucht und mittels Fluoreszenz Activated Cell Sorting (FACS) analysiert. Die vorliegende Arbeit verfolgt folgende Ziele:

1. Eine vollständige Durchflusszytometrische Analyse und Charakterisierung der ILC2s aus induzierten Sputum und aus peripheren Blutleukozyten sowie die Bestimmung prozentualer Anteile der ILC2s, abhängig von der Erkrankung und der Therapie (mit und ohne SCIT) des Probandenkollektivs.
2. Charakterisierung von ILC2s im Sputum und im Peripheren venösen Blut während der Gräserpollensaison im Vergleich zu einer Zeit ohne Allergiebelastung außerhalb des Pollenflugs.
3. Korrelation der experimentellen Daten mit klinischen Ergebnissen. Diskussion der Zusammenhänge der Zellantwort mit klinischen Parametern und ihrer Konsequenz für den Klinischen Alltag.
4. Wichtigkeit der ILC2s für Allergische Rhinitis und Asthma Bronchiale

### **3. Material und Methoden**

#### 3.1 Materialien

Tabelle 3.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Verwendung</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Blutentnahmeadapter</b>	Multiple Sample Luer Adapter	BD Vacutainer
<b>Butterfly Kanülen</b>	Safety Multifly	BD Vacutainer
<b>Bronchodilatator</b>	Sultanol Dosier-Aerosol mit 200 Hub	GlaxoSmithKlein
<b>Deckgläser</b>	Menzel-Gläser 24 mm × 50 mm	Thermo Fisher Scientific
<b>Desinfektionsspray</b>	Octeniderm	Schülke
<b>Desinfektionsmittel für Instrumente</b>	Sekusept aktiv	Ecolab Healthcare
<b>Einwegkürette</b>	Rhino-Pro	ASI
<b>Einwegpipette</b>	Plastikpipette bis 3 ml	neoLab
<b>FACS Rörchen</b>	5 ml Röhrentubes	Sarstedt
<b>Falcon-Rörchen</b>	Cellstar (15, 50 ml)	Greiner Bio-One
<b>Objektträger</b>	Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Fisher Scientific
<b>Papierfilter</b>	Filter Papers 90 mm	Whatman
<b>PBMC-Rörchen</b>	Cell Preparation Tube	BD-Vacutainer
<b>Pipetenspitzen</b>	Standard 10 µl, 200 µl und 1000 µ	Eppendorf
<b>Pricktest</b>	Test-set: Nr. 901=NaCL, 902=Histamin, 006=Gräser, 108=Birke, 708= D. Farinea, 725= D.pteronysimus, 309=Katze)	Allergopharma
<b>Pricktest- Lanzetten</b>	Lanzetten Mediprick	Mediprick Allergy
<b>Reaktionsgefäße</b>	Safe seal 0,2 ml, 1 ml, 2 ml	Sarstedt
<b>Reaktionsgefäße-Aufbewahrung</b>	EPPI Box	National Lab

<b>Verwendung</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Serumröhrchen</b>	S-Monovette 7,5 ml	Sarstedt
<b>Schwangerschaftstest</b>	HCG combo	Hitado
<b>Transferpipette</b>	3,5 ml	Sarstedt
<b>Zellkulturschale</b>	Petri dish	Fischer scientific
<b>Zellfilter</b>	Cell strainer 70 µm Nylon	BD Falcon
<b>Zytospinfilterkarte</b>	Shandon Filter Cards	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 3.2 Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ampuwa Sterilwasser</b>	Fresenius Kabi
<b>DPBS</b>	Gibco
<b>Eukitt</b>	Fluka
<b>Kochsalzlösung: NaCl in 3%, 4% und 5%</b>	Rechts der Isar
<b>FACS Clean</b>	BD Bioscience
<b>FACS Rinse</b>	BD Bioscience
<b>Sputolysin</b>	Merck
<b>Methanol</b>	Fluka
<b>Giemsa</b>	Merck
<b>May-Grünwald-Lösung</b>	Merck
<b>Xylol</b>	Merck
<b>Intracellular Fixation + Permeabilization Buffer Set</b>	Invitrogen
<b>RNAProtect Cell Reagent</b>	Qiagen
<b>Fetal Bovine Serum</b>	HyClone
<b>Potassium Phosphat Buffer (0,05ml/l und 0,015 ml/l)</b>	CCB Innsbruck
<b>Trypan Blue Stain 0,4%</b>	Gibco

Tabelle 3.3: Geräteliste

<b>Verwendung</b>	<b>Geräte/ Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Blutdruckmessgerät</b>		Boso medicus
<b>Durchflusszytometriegerät</b>	FACS Fortessa	BD
<b>Laptop</b>	Dell PC	Dell
<b>Mikroskop</b>	Axiovert 40C	Zeiss
<b>Mikroskop</b>	DMRB	Leica
<b>Nasenspekulum</b>		Christophorus CBC
<b>Pipettierhilfe</b>	Swift PET	Bimed
<b>Pipetten</b>	100-1000µl 10-100µl 0,5-10µl 0,1-2,5µl	Alle Eppendorf
<b>Spirometer</b>	Handspirometer Spiro/Pro	Jaeger
<b>Sputuminduktion</b>	Pari Turbo Boy SX	PARI
<b>Vortex</b>	Genie 2	Scientific Industries
<b>Waage</b>	PB303 Delta Range	Mettler Toledo
<b>Zählkammer</b>	Neubauer Improved	Marienfeld
<b>Zentrifuge für die Aufbereitung der nasalen Sekrete</b>	5430R	Eppendorf
<b>Zentrifuge für die PBMC Aufbereitung</b>	ROTINA 380R	Hettich
<b>Zentrifuge zur Vorbereitung von ImmunoCAP</b>	EBA20	Hettich
<b>Zytospin Zentrifuge</b>	Cytospin 4	Thermo fischer scientific

Tabelle 3.4: Antikörper

Produkt	Hersteller	Produktnummer
<b>APC/Cy7 anti-human CD45</b>	Biologend	304014
<b>Mouse BALB7c IgG1 PE-CF594</b>	BD	563589
<b>Mouse IgG1 BV421</b>	BD	566094
<b>Mouse IgG1 BV605</b>	Biologend	339916
<b>Mouse IgG1 BV711</b>	Biologend	351328
<b>Mouse IgG1 FITC</b>	Biologend	348801
<b>Mouse IgG2b BV421</b>	Biologend	653813
<b>Mouse IgG2a PerCP-eF710</b>	eBioscience	46-7098-42
<b>Rat/IgG1 APC</b>	Biologend	501907
<b>Rat IgG1 PE</b>	eBioscience	12-7052-82
<b>Rat IgG2a BV421</b>	BD	562992

## 3.2 Probanden

### 3.2.1 Ethische Richtlinien

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München stimmte der Durchführung dieser Studie zu (.55.2-1-54-2532-50-2017). Die Probanden wurden ausführlich aufgeklärt, schriftlich sowie mündlich und danach gebeten eine Einverständniserklärung zu unterschreiben. Während der Aufklärung wurden die Risiken, die Vorgehensweise sowie die Ziele der Studie genau erläutert. Es war den Probanden möglich jederzeit abzubrechen falls dies gewünscht war.

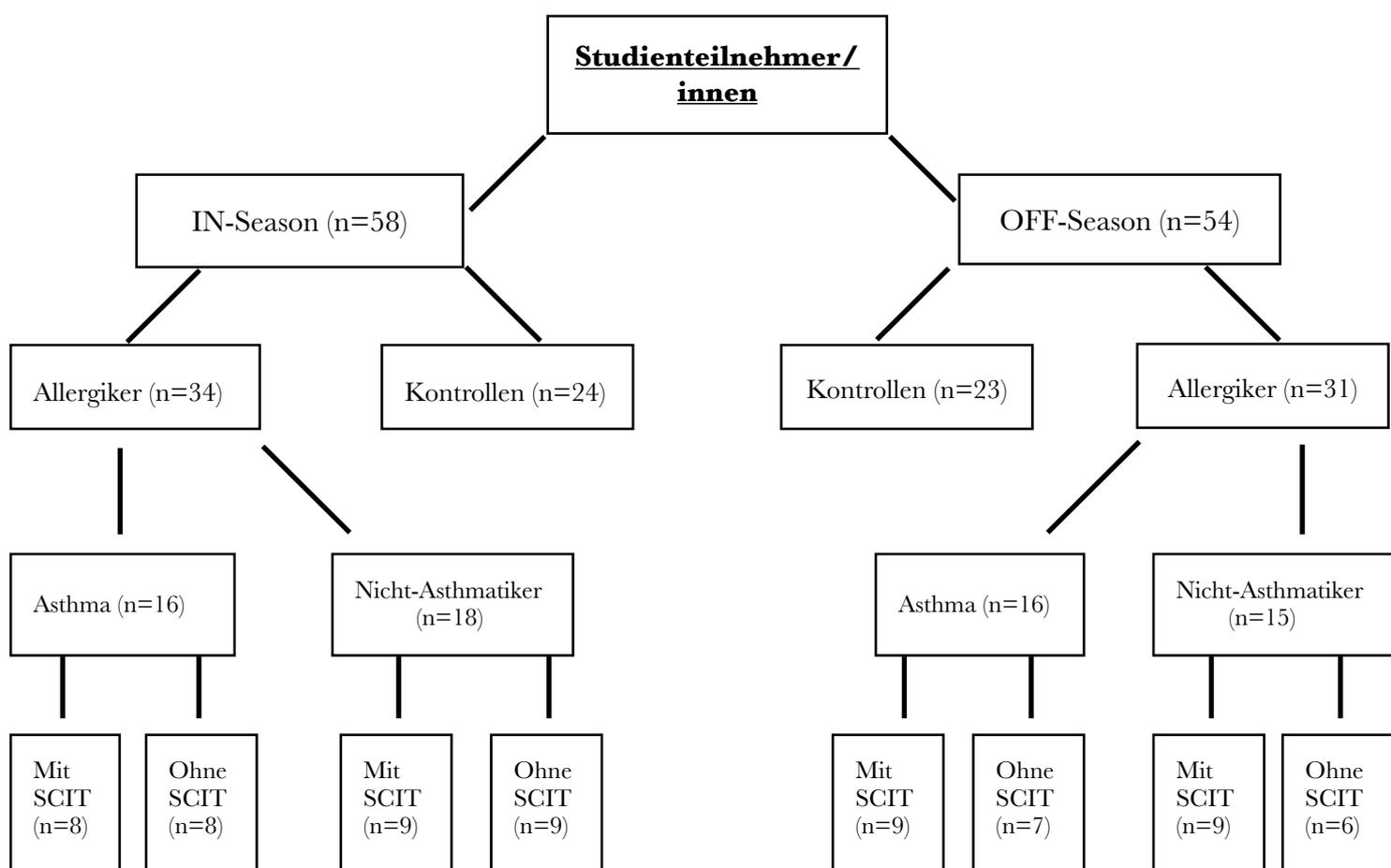
### 3.2.2 Probandenkollektiv

Es wurden während zwei Messzeiträume für die Studie Proben genommen. Der erste Zeitraum erstreckte sich von Anfang April bis Anfang August und wurde als IN-Season bezeichnet. Dies bedeutet, dass in diesem Zeitraum eine Pollenbelastung gegeben war. Die OFF-Season wiederum erstreckte sich von Mitte Oktober bis Anfang Februar und repräsentierte die Zeit ohne Pollenflug. Das Probandenkollektiv wurde in beiden Zeiträumen klinisch untersucht, Zellmaterial gewonnen und die Proben dann weiter verarbeitet.

Das Probandenkollektiv unterteilte sich sowohl in der IN-Season und der OFF-Season in anamnestisch und klinisch nachgewiesene Allergiker und einer entsprechenden Kontrollgruppe (Siehe Abb. 3.1). Die Allergiker wurden jeweils unterteilt in Probanden mit und ohne asthmatischen Beschwerden. Diese dann nochmals unterteilt nach Probanden mit und ohne Subkutane spezifische Immuntherapie (SCIT). Die Kontrollgruppe war frei von jeglichen Allergien. Dies wurde mittels eines kutanen Allergietests und einer ImmunoCAP Untersuchung bestätigt. Aufgenommen in die Probandengruppe wurden Nichtraucher zwischen 18-65 Jahren. Schwangerschaft war ein Ausschlusskriterium. Um eine Verfälschung von Daten zu verhindern durfte während der Testung kein akuter Atemwegsinfekt vorliegen. Probanden mit systemischer Erkrankungen oder systemischer Immunsuppression wurden, so weit sie anamnestisch vorlagen, ausgeschlossen.

Die Zuordnung der Probanden zu den einzelnen Kollektiven erfolgte durch eine ausführliche Anamnese, einem Pricktest (kutaner Allergietest) und einer ImmunoCAP Untersuchung. In der ImmunoCAP Untersuchung wurde im Serum der Gesamt-IgE Spiegel gemessen und die spezifischen IgE Konzentrationen für jedes im Pricktest positiv getestete Allergen bestimmt.

In der IN-Season haben 58 Probanden an der Studie teilgenommen. Davon waren 24 Kontrollen und 34 Allergiker. In dieser Gruppe waren 16 zusätzlich Asthmatiker und von diesen hatte eine Hälfte eine SCIT. Von den 18 Allergikern ohne Asthma waren ebenfalls die Hälfte mit Immuntherapie. In der OFF-Season wurden alle Teilnehmer erneut eingeladen. Vier Probanden schieden aus der Studie aus wegen non-compliance bzw. Krankheit. Zwei Probanden wechselten die Probandengruppe, da sie eine SCIT begonnen hatten.

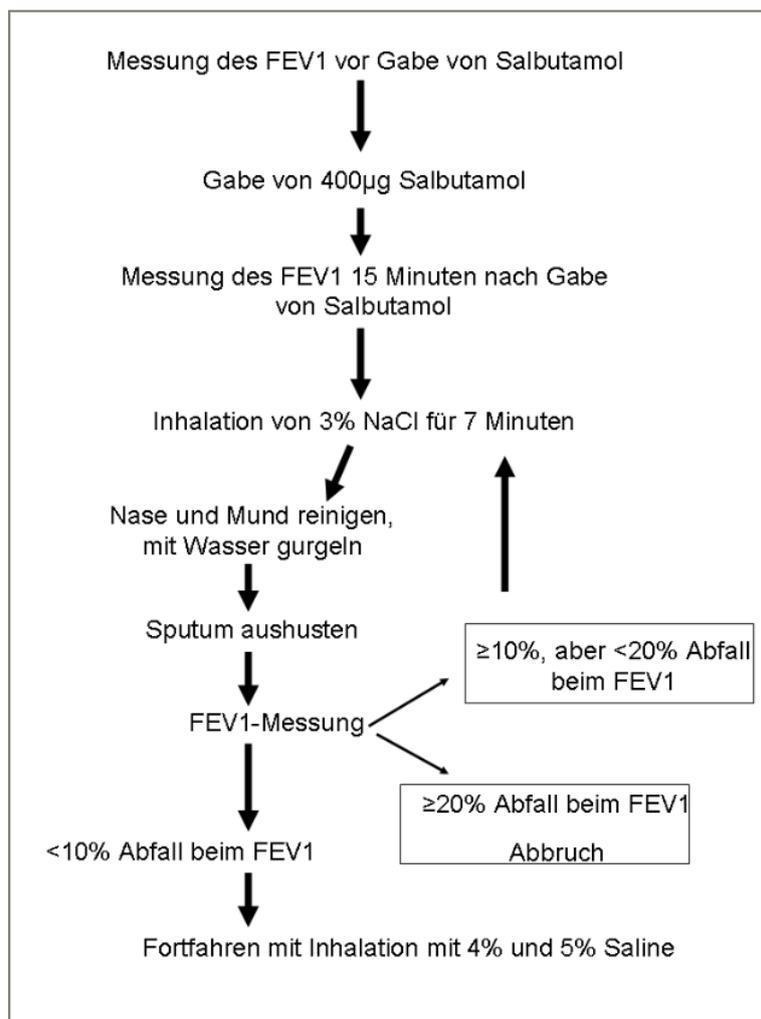


**Abbildung 3.1:** Darstellung des Probandenkollektivs und ihrer Untergruppen.

### 3.3 Die Sputumgewinnung und -aufbereitung

#### 3.3.1 Sputuminduktion

Die Methodik sowie die Durchführung der Sputumgewinnung und -aufbereitung beruhte sich auf bereits vorhandene Sputum SOPs (Ziñler, 2012). Jeweils zwei Probanden wurden gleichzeitig induziert. Die Induktion begann jeweils mit einer Lungenfunktion, die dreimal wiederholt wurde. Unter Anleitung wurde die Einsekundenkapazität (FEV1) bestimmt, der Tiffeneau-Index (FEV1/FVC) und die expiratorische Atemstromstärke bei 50% sowie 25% der Vitalkapazität (MEF50 und MEF25). Eine Bronchospasmyse wurde mit 4 Hüben Salbutamol, entsprechend einer Dosis von 400 Mikrogramm, erreicht. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde die



**Abbildung 3.2:** Arbeitsprotokoll der Sputuminduktion

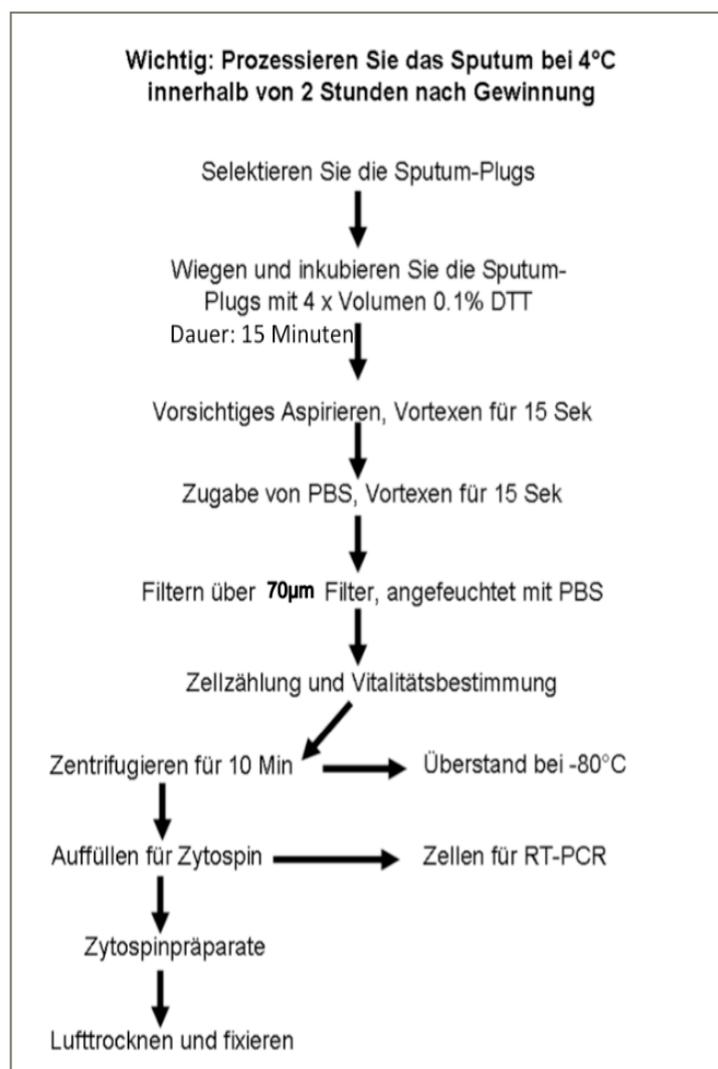
Quelle: Ziñler, 2012

Lungenfunktion erneut dreimal wiederholt. Um den Lyse-Effekt dokumentieren zu können wurde der höchst gemessene FEV1-Wert als Richtwert festgelegt. Aus Sicherheitsgründen durfte während der ganzen Untersuchung dieser Wert nicht um mehr als 10% abfallen.

Die Probanden inhalierten, zur Induktion, über einen Ultraschallvernebler (Pariboy) dreimal, jeweils 7 Minuten lang, eine NaCl-Lösung in aufsteigender Konzentration (3%, 4% und 5%). Die Probanden wurden gebeten aufrecht zu sitzen, gleichmäßig tief zu atmen sowie eine Nasenklemme zu tragen, um eine reine Mundatmung sicherzustellen. Darauf folgte eine Reinigung der Nase, (Schnäutzen in eine Papiertaschentuch) und des Mundes (gurgeln mit Leitungswasser) um die Kontaminierung mit Plattenepithelzellen zu minimieren. Durch forciertes Husten wurde Sputum der Probanden aus den unteren Atemwegen mobilisiert und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Zwischen den Inhalationen wurden die Röhrchen auf Eis gelagert. Nach jeder Inhalation wurde die Lungenfunktion wiederholt und mit den vorangegangenen FEV1-Werten verglichen.

### 3.3.3 Sputumaufbereitung

Die gewonnenen Sputumproben wurden schnellstmöglich (max. 2 Std.) weiterverarbeitet. Während der gesamten Aufbereitungszeit wurden die Proben stets eisgekühlt gelagert. Die kühle Lagerung sowie eine kurze Liegezeit sind wichtig um ein vermehrtes Absterben der Zellen. Die Gesamtsputummenge wurde ermittelt, bevor einzelne Sputum-Plugs, möglichst ohne Saliva, mit einer Pinzette in ein frisches und gewogenes 50-ml Falcon überführt wurden. Die Proben wurden jetzt erneut gewogen und dann eine 1:10 verdünnte Sputulysinlösung in der vierfachen Menge dazugegeben. Anschliessend wurde die Mischung für 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die zweifache Menge an DPBS hinzugefügt und die Probe für 15 Sekunden



**Abbildung 3.3:** Flowchart für die Sputumaufbereitung

Quelle: Ziβler, 2012

gemischt (Vortex). Nach Filtrierung über ein  $70\ \mu\text{m}$  Zellsieb wurden  $10\ \mu\text{l}$  der Zellsuspension, für die Zellzahlbestimmung beiseite gelegt. Die restliche Suspension wurde bei 2000 rpm für 10 min. bei  $4^\circ\text{C}$ , mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Vier Aliquots pro Proband mit  $200\ \mu\text{l}$  Überstand wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Ein weiteres Aliquot wurde mit  $1000\ \mu\text{l}$  Überstand plus  $1000\ \mu\text{l}$  Methanol eingefroren.

## 3.4 Zytospins

### 3.4.1 Herstellung und Färbung

Für die Herstellung der Zytospins und der Durchflusszytometriefärbung wurde die gewonnene Zellsuspension benutzt. Für jeden Probanden wurden vier Zytospins angefertigt, zwei mit 75  $\mu$ l und zwei mit 100  $\mu$ l. Diese vier Objektträger wurden für 6 Min. bei 450 rpm zentrifugiert, 30 min. abgedunkelt getrocknet und 5 Minuten im Methanolbad fixiert.

Zunächst musste für die Pappenheim Färbung eine Giemsa-Lösung im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und gefiltert werden. Die May-Grünwald Lösung wurde ebenfalls filtriert. Danach, wurden jeweils 8 der vorbereiteten Objektträger in der Färbewanne mit der May-Grünwald Lösung für 8 Min. gefärbt und anschliessend gründlich mit Leitungswasser gespült. Im nächsten Schritt wurden die Slides für 35 Min. in der vorbereiteten Giemsa-Lösung gefärbt und erneut gewaschen. Nachdem die Objektträger lichtgeschützt getrocknet waren, wurden sie für 10 sek. in Xylol getaucht, getrocknet und mit drei Tropfen Eukitt sorgfältig, blasenfrei, auf die Deckgläschen gedrückt.

### 3.4.3 Differenzierung der Zellen im Sputum

Zur Bestimmung des Differenzialbildes des Sputums, nach Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophilen-, Eosinophilen-, und Basophilen Granulozyten wurde eine der vorbereiteten Objektträger in 4 Beobachtungsfelder unterteilt. Pro Feld wurden mäanderförmig, von zwei unabhängigen Personen, jeweils 100 Zellen (ohne Squamöse Zellen) gezählt. Die Prozentuale Verteilung auf die verschiedenen Zelltypen wurde errechnet.

Als Richtwert wurden folgende Normwerte im Sputum beim Erwachsenen genommen (Ziöbler, 2012):

Makrophagen: 57-80%

Neutrophile Granulozyten: < 35%

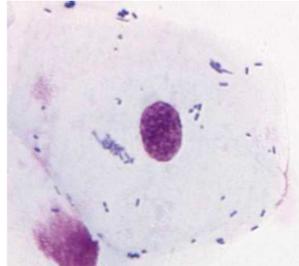
Eosinophile Granulozyten: < 2%

Lymphozyten: < 3 %

*Plattenepithelzellen (Squamöse Zellen):*

Bei der Sputuminduktion muss auf eine gründliche Reinigung der Nase und des Mundes geachtet werden um den Anteil der Plattenepithelzellen so gering wie möglich zu halten. Ein Anteil von

<10% (Pokieser et al., 2011 vgl. S. 71) charakterisiert ein qualitativ hochwertiges Sputum. Plattenepithelzellen sind typischerweise unter dem Mikroskop als große Zellen mit 4-7 Ecken und Kanten von ungleicher Seitenlänge mit kleinem in der Mitte liegendem runden Kern zu erkennen (von Hoesslin, 2013 vgl. S. 147).

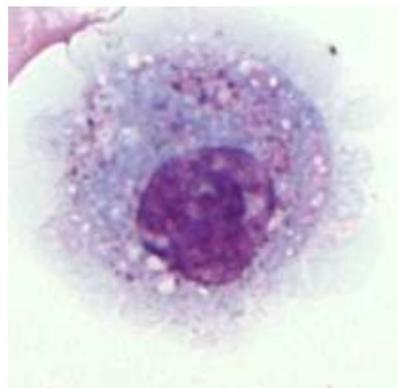


---

**Abbildung 3.4:** Squamöse Zelle  
(Ziβler 2012)

*Alveolarmakrophagen:*

Sie bilden mit 60-90% den Hauptteil der Zellen im Sputum und phagozytieren totes Material oder Fremdpartikel (zB Staub)(Ziβler, 2012). Monozyten reifen zu Makrophagen aus und werden daher bei der Auszählung mitgewertet.



---

**Abbildung 3.5:** Alveolarmakrophage  
(Ziβler 2012)

*Leukozyten:*

Leukozyten (ca. 5000-6000 pro mm<sup>3</sup>) dienen der Abwehr pathogener Mikroorganismen. Zu ihnen gehören Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten diese unterscheiden sich in Zellgröße, Kernmorphologie sowie Granula. Alle Leukozyten Zelltypen werden im Sputum gefunden.

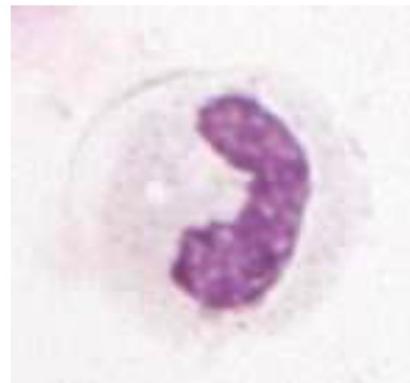
*Neutrophile Granulozyten*

Neutrophile Granulozyten haben eine Schlüsselrolle während einer akuten Entzündungsreaktion. Der prozentuale Anteil im Sputum (1-40%) ermöglicht den Grad einer Entzündung genauer einzuschätzen (Ziβler, 2012). Bakterien bekämpfen Neutrophile Granulozyten über Phagozytose und NETose (Deller, 2018vgl. S. 228). Die NETose beschreibt die Bildung von "Neutrophil Extracellular Traps" die zur Immunabwehr genutzt werden. Im Sputum sind die neutrophilen Granulozyten über ihren stab- oder segmentförmigen Kern zu identifizieren.



---

**Abbildung 3.6:** Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Ziβler 2012)

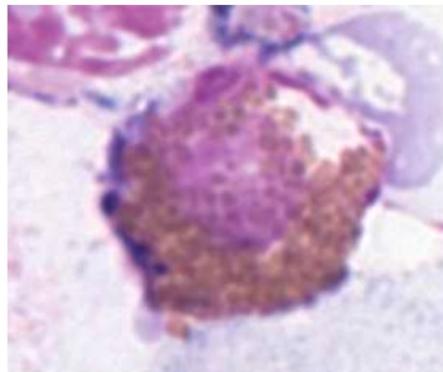


---

**Abbildung 3.7:** Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Ziβler 2012)

### *Eosinophile Granulozyten*

Eosinophile Granulozyten spielen eine komplexe Rolle als Aktivatoren und Mediatoren bei entzündlichen und immunologischen Prozessen (Deller, 2018 vgl. S. 228). Bei allergischen Reaktionen (z.B. Asthma) sind sie im Rahmen einer Eosinophilie (mehr als 500 Eosinophile/mm<sup>3</sup>) erhöht. Darüberhinaus spielen sie eine Rolle für die Abwehr von Parasiten (v.a. Würmer). Mikroskopisch imponiert ein zweigeklappter heterochromatinreicher Kern, sowie charakterisierende, große rote Granula.

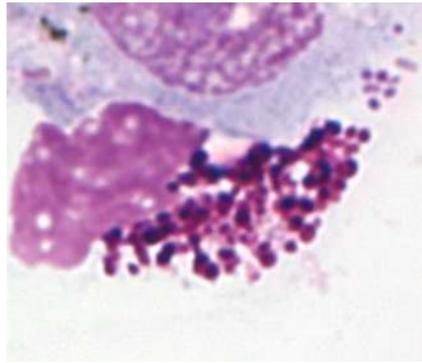


---

**Abbildung 3.8:** *Eosinophiler Granulozyt (Zißler 2012)*

### *Basophile Granulozyten*

Für Basophile Granulozyten wird eine funktionelle Übereinstimmung mit Mastzellen beschrieben. Sie haben an ihrer Oberfläche IgE Rezeptoren und setzen nach Vernetzung des gebundenen IgE durch das Antigen Histamin frei (Deller, 2018 vgl. S. 228). Diese Zellen sind selten und über ihre normale Funktion ist noch wenig bekannt. Sie werden aber vergesellschaftet mit Parasitosen und allergischen Erkrankungen gesehen. Mikroskopisch charakterisiert diese Zellen unterschiedlich große violett-blaue Granula.



---

**Abbildung 3.9:** Basophiler Granulozyt (Zißler 2012)

### *Lymphozyten*

Die Lymphozyten werden in zwei Typen unterteilt, die B - (10-15 %) und T- Lymphozyten (70-80%). Lymphozyten gehören zu der spezifischen Immunantwort. Die Gruppen kann man im Sputum nicht unterscheiden. Lymphozyten sind in der Pappenheim-Färbung als kernhaltig, mit einem granulierten Zellplasma charakterisiert (Zißler, 2012).



---

**Abbildung 3.10:** Lymphozyt (Zißler 2012)

## 3.5 Gewinnung und Aufbereitung PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

### 3.5.1 PBMC-Gewinnung

Die PBMC Gewinnung entspricht initial einer gewöhnlichen Blutabnahme über eine Safety-Multifly-Kanüle (Butterfly). Ein Serumröhrchen für die IgE Bestimmung wurde bei 6000 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Vier weitere Vacutainer CPT Röhrchen zur PBMC Bestimmung wurden gewonnen und bei 3000 RPM, 30° C für 20 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang dient der Zellstabilisierung bis zur weiteren Bearbeitung.

### 3.5.2 PBMC-Aufbereitung

Durch die Zentrifugierung der CPT Röhrchen wurden bereits die Erythrozyten durch das Gel gepresst und so erreicht, dass oberhalb des Gels lediglich die Leukozyten im Blutserum noch zu finden sind. Diese gewonnen Leukozytensuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und erneut für 10 min. zentrifugiert (RPM 1200 ° C). Der so gewonnene Serumüberstand wurde unter Schonung der Zellpellets auf jeweils fünf Aliquots, pro Proband, und bei -80 °C eingefroren. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 10ml sterilen DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1200 RPM, 10 Min. Bei 20 °C). Der Überstand wurde verworfen die Zellpellets nochmals mit DPBS suspendiert. Die jetzt gewonnene Zellsuspension, stellt die Basis für Zellzählung und Antikörperanalyse dar.

### 3.5.3 Zellzählung der Sputum- und PBMC-Proben

Die Anzahl vitaler Zellen im Blut und des Sputums wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die PBMCs wurden 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Nach einer zweiminütigen Einwirkzeit wurden 10 ml in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop alle lebenden Zellen in allen 4 Quadranten ausgezählt. Basierend auf dem Mittelwert wurde das notwendige Verdünnungsverhältnis des DPBS ermittelt, um die angestrebte Zellzahl von  $0,5 \times 10^6$  für die Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) zu erreichen.

Die aus dem Sputum gewonnene Zellsuspension wurde ebenfalls mit Trypanblau gemischt (Verhältnis 1:1). In der Neubauer-Zählkammer wurden neben den vitalen und nicht vitalen Lymphozyten auch die Plattenepithelzellen erfasst. Lebende Zellen leuchten hell unter dem Mikroskop, die avitalen, hingegen, sind blau angefärbt. Es wurde ebenfalls über allen 4 Quadranten ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Eine geringe Zahl avitaler Zellen und möglichst wenig Plattenepithelzellen sprechen für die Vitalität und Reinheit des Sputums.

## 3.6 Begleitende Untersuchungen

### 3.6.1 Ablauf

Die Probanden wurden im Rahmen ihres Anamnese- und Aufklärungsgesprächs nach ihrem aktuellen Beschwerdebild, ihrem Medikamentenplan, ihrem Rauchverhalten sowie Vorhandensein atopischer Erkrankungen befragt. Bei bekannten Asthmatikern wurden auch der GINA-Score (The Global Initiative for Asthma 2012) errechnet. Der Score ermöglicht eine Aussage über den Grad der medikamentösen Krankheitskontrolle.

Blutdruck- und Pulsmessung erlaubten das Kardiovaskuläre Risiko abzuschätzen. Über Fragebögen wurde der subjektive Stresslevel und die Beeinträchtigung der Lebensqualität durch eine vorhandene Allergie bestimmt. Der Mini-RQLQ (Rhinoconjunctivitis Quality of life Questionnaire) erfasst die Einschränkungen der Alltags- und Freizeitaktivitäten, des Schlafes und den Schweregrad der rhinokonjunktivalen Symptome in der letzten Woche. Der subjektiv empfundene Stresslevel, ein Gefühl der Überforderung, Anspannung oder Erschöpfung in den letzten 4 Wochen wurde vom PSQ (Perceived Stress Questionnaire) erfasst (siehe Anhang).

Bei der Erstvorstellung wurden alle Probanden einem Haut-Prick-Test unterzogen. Hierbei wurde eine Negativ- (NaCl) und eine Positivkontrolle (Histamin) sowie Gräser, Birke, Katzenepithel, Dermatoides Farinae und Dermatoides Pteronyssinus untersucht. Die Größe der Quaddel wurde nach circa 20 Min. mit einem Prick-Test-Lineal ausgemessen und dokumentiert. Wie bereits erwähnt, wurde bei allen Probanden der Gesamt-IgE-Wert (ImmunoCAP) bestimmt. Bei Probanden mit auffälligem Prick-Test wurde das entsprechende Allergen im ImmunoCAP-Test bestätigt. Bei Probanden mit unauffälligem Prick-Test aber auffälliger Anamnese wurde noch der SX1 veranlasst. Dies ist ein Screeningtest für Inhalationsallergene (Lieschgrass, Roggen, Katzenschuppen, Hundeschuppen, Birke, Beifuss, D. Pteronyssinus, Cladosporium Herbarium).

Vor der Sputuminduktion wurden zwei absorptive Membranen zur Asservierung von Nasensekret, mit Hilfe eines Spekulums und einer Klemme, für 1 Min. an das Nasenseptum auf Höhe der Nasenmuschel eingelegt. Nach beidseitiger Wiederholung wurden drei Membranen in das Siebträgerröhrchen zurückgelegt und diese für eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C, vorgekühlt und anschliessend bei -20°C eingefroren. Das vierte Siebträgerröhrchen wurde mit 300 µl sterilem PBS

aufgefüllt und ebenfalls für eine Stunde im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert und dann für 5 Minuten bei 6000 rpm und 4° C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sieb mit der absorptiven Membran entfernt und bei -20°C eingefroren.

Unter Zuhilfenahme eines Nasenspekulums wurde die untere Nasenmuschel sichtbar gemacht und mit einer Einwegkürette Zellmaterial gewonnen. Das entnommene Material wurde dann in einem kleinen Röhrchen gelöst, das bereits mit 300 µl RNA-Protect gefüllt war. Die gewonnene Probe wurde ebenfalls bei -20°C eingefroren.

## 3.7 Durchflusszytometrieanalyse (FACS)

### 3.7.1 Durchflusszytometrieanalyse

Mit der Durchflusszytometrie (FACS-Fluoreszenz Activated Cell Sorting) können Zellen nach Oberflächenmarkern und intrazellulären Merkmalen sortiert werden. Der Durchflusszytometer ist ähnlich wie ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop (Gompf et al., 2015)(vgl.S. 1), das mit Hilfe von Lichtstreuung und Fluoreszenzmarkierung die Zellen sortiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt über Antikörper, die sich an „Marker-Moleküle“ auf der Zelloberfläche binden. Diese Marker sind Strukturen auf der Zellmembran, die in der Regel Rezeptorfunktionen übernehmen und die Unterscheidung der verschiedenen Lymphozyten möglich machen (Linnemann and Kühl, 2006)(vgl.S. 790). Die Marker werden nach dem CD-System (Cluster of Differentiation) CD1-300 nummeriert. Das Muster der CD+ Marker lässt Rückschlüsse über den Zelltyp zu. Nach Fluoreszenzmarkierung werden die Antikörper in der Zellsuspension über einen Laser angeregt. Dadurch entstehen verschiedene Phänomene der Lichtemittierung und Streuung. Über Lichtintensität wird die Anzahl der Antikörper Bindungsstellen sichtbar. Die optischen Signale werden durch Photodetektoren in einen Elektronenstrom konvertiert, in einen Spannungspuls transformiert und in differenzierten Auswertungsprogrammen analysiert (Gompf et al., 2015)(vgl. S.9). Auf diese Weise konnte zielgerichtet nach den uns interessierenden Zellen (ILC2s) gesucht werden.

### 3.7.2 Färbung mit Antikörpern

Für die FACS-Analyse wurden pro Proband jeweils vier Wells (Probenträger), zwei für Sputumzellen gefärbt/nicht gefärbt und PBMC gefärbt/nicht gefärbt, auf einer 96-Well-Platte, befüllt. Die ungefärbten Zellen dienten der Negativkontrolle. Mit der vorbereiteten Zellsuspension (Sputum  $0.2 \times 10^6$  Zellen, pBMC  $0,5 \times 10^6$  wurde je ein Well befüllt. Die vorbereitete Well-Platte wurde bei 1200 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Die Wells die mit Sputum gefüllt waren wurden 100  $\mu$ l Dilute TruStain, in einer 1:20 Mischung mit PBS, hinzugefügt. Nach Inkubation von 15 Min. bei 4° C wurden Sputum-Well-Platten für 5 Min bei 1200 rpm zentrifugiert und der überstand abschliessend verworfen.

Alle folgende Schritte wurden parallel für Sputum und PBMCs, an Tag 1 der Färbung durchgeführt.

Nach der Vorbereitung von Fixable Viability Stain (FVS), in einer Mischung von 1:1000 mit vorgekühltem PBS wurde jeweils 50  $\mu$ l dieser Mischung auf jedes der „gefärbten“ Wells pipettiert und anschliessend bei 4° C für 10-15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation, wurden 200  $\mu$ l PBS addiert, vorsichtig resuspendiert und zentrifugiert für 5 Min. bei 1200 rpm. Im nächste Schritt wird eine 1:200 Mischung mit FACS-Puffer (SURFACE Mastermix) für das Oberflächenstaining vorbereitet. Zu den gefärbten Samples wurden 25  $\mu$ l von diesem SURFACE Mastermix addiert, resuspendiert und bei 20 Min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden erneut 200  $\mu$ l des FACS Puffers addiert, erneut resuspendiert und für weiter 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Die nächsten Schritte dienen der Vorbereitung der Fixationslösung. Diese wird aus einem Teil FoxP3 Fixation/Permeabilization Konzentrat und drei teilen FoxP3 Fixation/Permeabilization Verdüner erstellt und danach jeweils 100  $\mu$ l zu allen Samples addiert. Nach Resuspendierung folgt die inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Letztlich wurde an Tag 1 die PermWash-solution (350  $\mu$ l/pro Sample) vorbereitet, mit 1:10 in H2O verdünnt (Millipore) und die Samples damit einmal gewaschen und zentrifugiert (5 Min, 1200 RPM). Abschliessend wurden erneut 100  $\mu$ l PermWash-Solution addiert und die Zellsuspension über Nacht im Kühlschrank bedeckt gelagert.

An Tag 2, wurde nun das intrazelluläre Staining vorbereitet (PermWash 1:100 für Cytokine, 1:50 für Transkription). Nach anschliessendem Zentrifugieren und Verwerfung des Überstandes wurden zu den gefärbten Wells 25  $\mu$ l dieser intrazellulären Staining Mischung addiert, resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss, wurde 100  $\mu$ l PermWash-solution addiert, erneut zentrifugiert, mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und die gewonnene Mischung in den LSR Fortessa Flow Cytometer eingelesen.

Tabelle 3.5: Darstellung der Antikörper und Isotypen die für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Isotypen
<b>CD45 APC-Cy7</b>	APC/Cyanine7 Mouse IgG1, $\kappa$ Isotype Ctrl Antibody
<b>Lineage Marker AF-488</b>	AF488 Armenian Hamster IgG, Rat IgG2b, Rat IgG2a
<b>IL7RA BV711</b>	BV711 Mouse IgG1, $\kappa$
<b>CRTh2 BV650</b>	BV650 Rat WI, also known as Wistar (outbred) IgG2a, $\kappa$
<b>IL13 APC</b>	APC Rat IgG1, $\kappa$ Isotype Control RUO

### 3.7.3 Kompensation

Bei überlappenden Fluoreszenzspektren macht sich eine Fluoreszenz bemerkbar, die im Rahmen einer Kompensation abgezogen werden muss. Um die Positivität von Aktivierungsmarkern zu bestimmen und zu kontrollieren wurde das Prinzip der Fluoreszenz minus one (FMOs) und der Single Colours eingesetzt. Sowohl in der IN- als auch in der OFF-Season wurde zu Beginn der Experimente eine Kompensation durchgeführt.

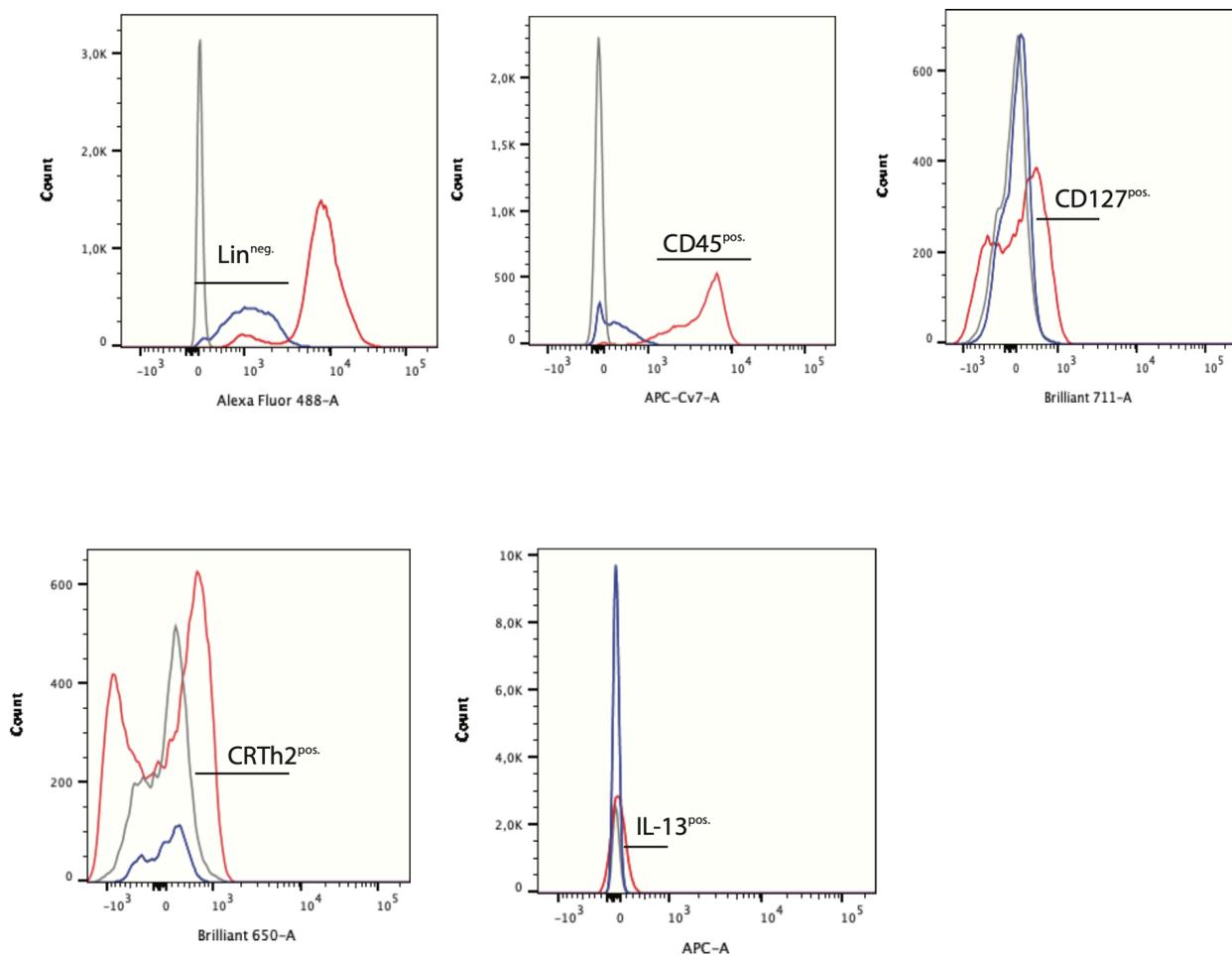
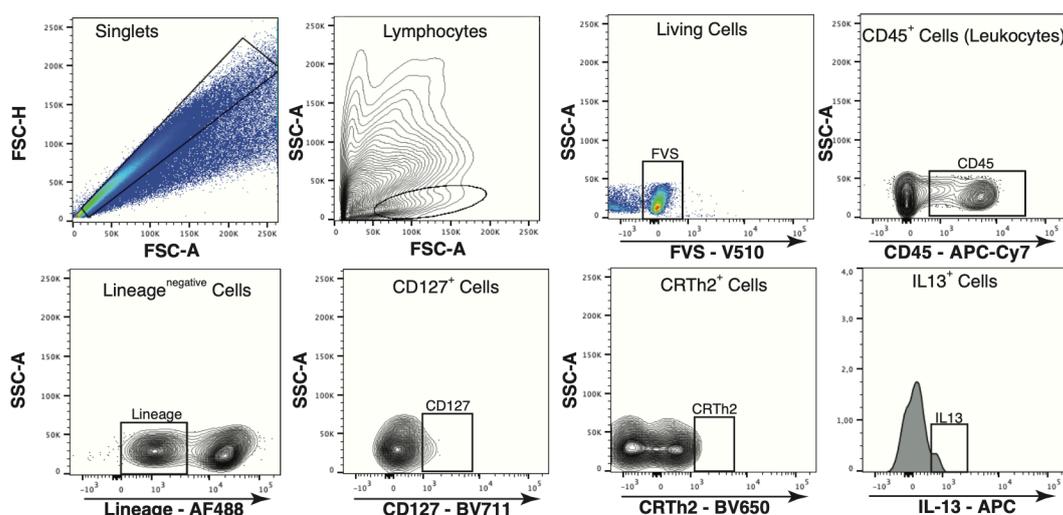


Abbildung 3.11: Darstellung der Kontrollen als FMOs für die ILC2s

### 3.7.4 Sputum-Panel

Über die gewählten Oberflächenmarker war es möglich die ILC2 im Sputum und Blut sichtbar zu machen. Bei beiden Medien wurde die gleiche Gating-Strategy eingesetzt. So ist ein direkter Vergleich der beiden Kompartimente und der Grad der lokalen und systemischen Entzündung im Körper darstellbar. Das initiale Gating fokussierte sich auf einzelne Zellen (Singlets), die Lymphozyten Populationen und vitalen Zellen. Um die gewünschte Zellpopulation herauszufiltern folgten wir der Gating-Strategy der ILC2s von Bal et al. 2016 und Mjösberg und Eidsmo 2014 (Bal et al., 2016) (Mjösberg and Eidsmo, 2014). Diese start mit dem CD45+ Marker (Pan-Leukozytenmarker) der auf allen Leukozyten exprimiert wird. Alle Lineage negativen Zellen schliessen dann die Oberflächenmarker von T-, B- und NK-Zellen aus. Im nächsten Schritt suchten wir nach Zellen die positiv auf CD127 (IL7-RA), eine Zytokin-Rezeptor Untereinheit, und CRTH2, ein Prostaglandin-Rezeptor, sind. Diese beiden Marker sind nahezu immer auf Typ 2 Innaten Lymphoiden Zellen nachweisbar.



**Abbildung 3.12:** Darstellung der Gating-Strategy für ILCs

### 3.7.5 PBMC-Panel

Im peripheren Blut wurde die gleiche Gating-Strategy genutzt, die zuvor im Sputum-Panel zum Einsatz kam.

## **4. Ergebnisse**

### 4.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad-Prism verwendet. Es ermöglicht die Auswertung der absoluten Zellzahlen (#Events) und der relativen Zellzahlen (%Parent). Wir entschieden uns für die relative Zellzahl der ILC2s zu dem Gesamtzellaufkommen, da so die Relation zwischen den verschiedenen Zellzahlen gut darzustellen und eine bessere Aussage möglich war.

Zur statistischen Auswertung der Probandengruppen (Allergiker / Kontrollen) wurde ein unverbundener Test verwendet. Entscheidend für die Wahl des geeigneten Testes ist die Normalverteilung innerhalb der Gruppen und die wird vorher mit dem D`Agostino & Pearson Test bestätigt. Für eine Normalverteilung wird der t-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt. Liegt jedoch keine Normalverteilung vor wird der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Da in unserer Untersuchung der interindividuelle Unterschied der Sputumzusammensetzung sehr groß war fand sich keine Normalverteilung und wir setzten den Mann-Whitney-U-Test ein.

Um jedoch quantitative Veränderungen innerhalb einer Gruppe (z.B.: Allergiker i.s. vs Allergiker o.s.) zu vergleichen wurde ein verbundener Test verwendet. Hierbei ist erneut die Normalverteilung ausschlaggebend für die Wahl des Testes. Wie zuvor wurde bei Normalverteilung der t-Test herangezogen und der Wilcoxon-Rang-Test bei Stichproben die nicht normalverteilt waren. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Anova oder Kruska-Wallis test eingesetzt.

Zur Übersicht der klinischen Daten und der Sputumdifferenzierung wurde der Mittelwert +/- SEM (Standardabweichung) gebildet. Um Zusammenhänge von Zellpopulationen (z.B. ILC2s) mit klinischen Daten (z.B. IgE) darstellen zu können wurde der Spearman- oder Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt.

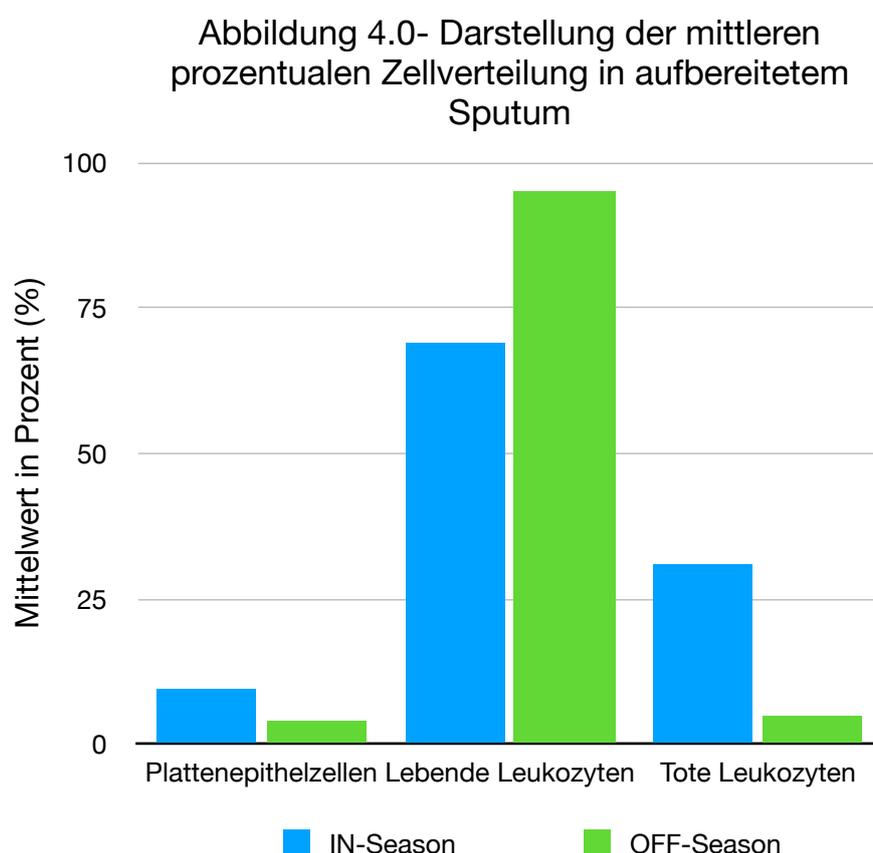
Die statistische Signifikanz bei beidseitiger Testung lag bei  $p < 0.05$  vor. Die verschiedenen statistischen Unterschiede wurden als  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$  dargestellt.

## 4.2 Klinische Daten

In diesem Abschnitt erfolgt die Darstellung der klinischen Daten. Begonnen wird mit Qualitätsmerkmalen und anschließend eine Analyse der wichtigsten klinischen Markern (z.B. Gesamt IgE, Lungenfunktion, Zelldifferenzierung). In der Tabelle 4.1. werden diese Zusammengefasst.

### 4.2.1 Sputumqualität

Die Sputuminduktion und die Aufbereitung basierten auf den SOPs der Doktorarbeit von Dr. Zissler (Zißler, 2012). Dieses Verfahren ermöglichten uns mittels Abhusten Sputum zu gewinnen. Im Sputum finden sich Leukozyten, Epithelzellen und Alveolarmakrophagen. Es kann bei unterschiedlichen Krankheitsentitäten zu Beimengungen von Blut, Eiter und Saliva kommen, die jedoch nicht ursächlich von der Sputuminduktion herrührt. Wichtig für die durchflusszytometrische Analyse ist eine geringe Verunreinigung mit Plattenepithelzellen aus Mund und Nase, welcher unter 10% liegen sollte. Des weiteren muss auf einen hohen Anteil an lebenden Leukozyten, möglichst über 70% geachtet werden. Dies wird durch eine sofortige Kühlung und schnelle Aufbereitung innerhalb von zwei Stunden sichergestellt.



In Abbildung 4.0 wird die prozentuale Zellverteilung vom Sputum in der IN- und der OFF-Season dargestellt. In der IN-Season gab es einen größeren Anteil an Plattenepithelzellen (Mittelwert-9,6%) und toten Leukozyten (30 %) im Vergleich zur OFF-Season (Plattenepithelzellen 3,9%, tote Leukozyten 5%). In der OFF-Season gab es einen sehr hohen Anteil an lebenden Leukozyten (94,9%).

## 4.2.2 Übersicht Klinische Daten

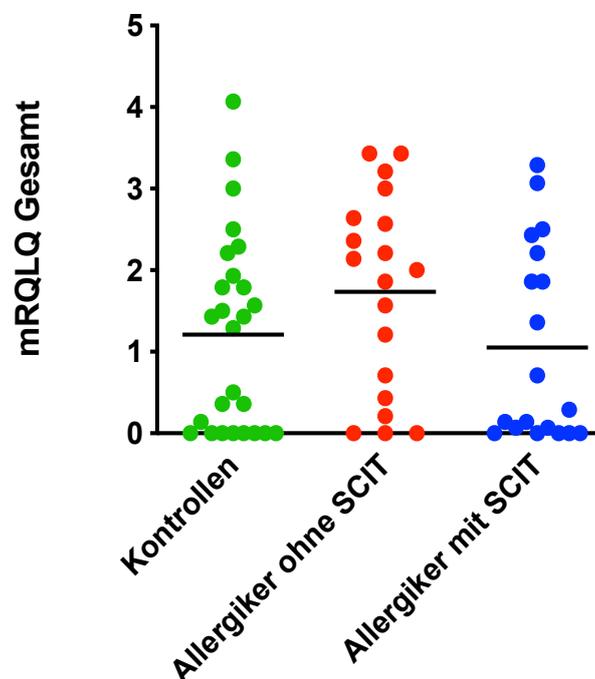
Tabelle 4.1: Übersicht Klinischer Daten und Sputumzelldifferenzierung der IN-Season (Mean +/- SEM)

	Kontrolle n	Allergische Rhinitis ohne SCIT	Allergische Rhinitis mit SCIT	Allergisches Asthma ohne SCIT	Allergisches Asthma mit SCIT
<b>Alter (Jahre)</b>	27.2±1.3	28.7±2.2	26.4±1.6	26.5±1.0	26.0±0.7
<b>mRQLQ Gesamtergebnis</b>	1.2±0.2	2.5±0.3	1.3±0.4	1.1±0.4	0.8±0.4
<b>mRQLQ Ergebnis Aktivitätseinschränkung</b>	0.1±0.1	1.3±0.3	1.0±0.3	2.0±0.3	1.0±0.2
<b>mRQLQ Ergebnis Praktische Probleme</b>	0.1±0.0	3.0±0.5	2.6±0.5	4.0±0.3	2.2±0.3
<b>mRQLQ Ergebnis Nasale Symptome</b>	0.2±0.1	2.8±0.5	2.3±0.5	3.6±0.3	2.6±0.3
<b>mRQLQ Ergebnis Augensymptome</b>	0.0±0.0	2.0±0.5	1.5±0.4	3.1±0.3	1.5±0.3
<b>mRQLQ Ergebnis andere Symptome</b>	0.3±0.1	1.8±0.5	1.2±0.3	2.9±0.3	1.3±0.2
<b>IgE (IU/L)</b>	16± 2	147.1±48.9	40.8±14.4	147.3±100.1	110.6±77.0
<b>FEV1 (L)</b>	3.7±0.2	4.2±0.3	3.9±0.1	3.8±0.2	3.5±0.2
<b>FVC (L)</b>	4.4±0.2	4.7±0.4	4.5±0.2	4.5±0.3	4.3±0.2
<b>MEF25 (L)</b>	2.2±0.1	2.2±0.4	2.4±0.2	2.1±0.2	1.8±0.3
<b>Gesamtzellzahl [x10<sup>4</sup>/ mL]</b>	47.3±8.7	134.2±31.4	42.8±9.3	178.1±94.8	19.6±2.9
<b>Macrophagen [%]</b>	84.9±3.0	87.0±2.0	86.6±2.7	80.5±6.6	85.2±5.8
<b>Neutrophile [%]</b>	14.0±3.0	9.5±1.4	11.3±2.1	15.5±4.7	14.2±5.7
<b>Eosinophile [%]</b>	0.5±0.2	2.6±1.0	1.0±0.2	2.5±1.5	0.4±0.2
<b>Lymphozyten [%]</b>	0.6±0.3	0.9±0.2	1.1±0.1	2.3±1.3	0.2±0.2

#### 4.2.3.1 Vergleich der Gesamt-IgE Werte

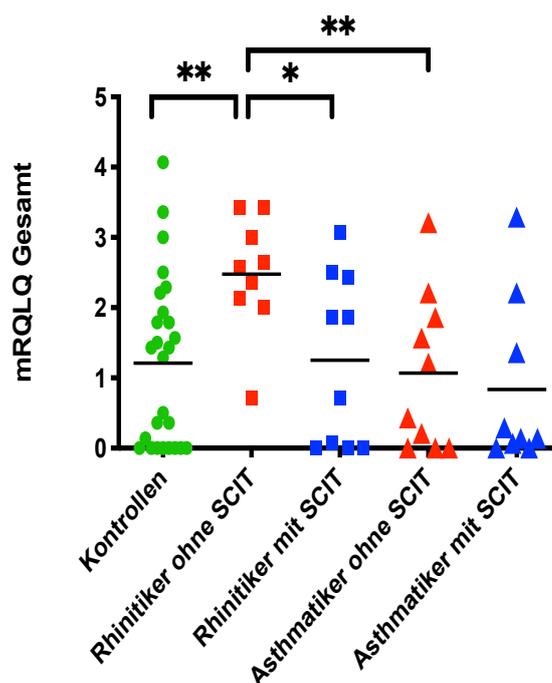
Der Gesamt-IgE Wert wurde bei allen Allergikern und gesunden Kontrollen im Blut einmal während der IN-Season bestimmt und spielt eine wichtige Rolle in der Allergiediagnostik. IgE Antikörper sind für die Abwehr gegenüber Mikroorganismen z.B. Viren wichtig. Bei Allergikern kann der Wert erhöht sein. Bei einem Gesamt-IgE < 25 U/mL ist eine Typ 1 allergische Reaktion unwahrscheinlich. Bei unseren Kontrollprobanden zeigte sich ein Mittelwert von ca. 16 U/mL. Der Gesamt IgE Wert bei Probanden mit und ohne SCIT unterscheidet sich deutlich (Tabl 4.1). Vor allem in der IN-Season ist der Unterschied bei Allergikern mit SCIT (Mean:  $40.8 \pm 14.4$  IU/L) und Allergikern ohne SCIT (Mean:  $147.1 \pm 48.9$  IU/L) eindrucklich.

#### 4.2.3.2 Vergleich des mini Rhinoconjunctivitis Quality of life (mRQLQ) Fragebogens



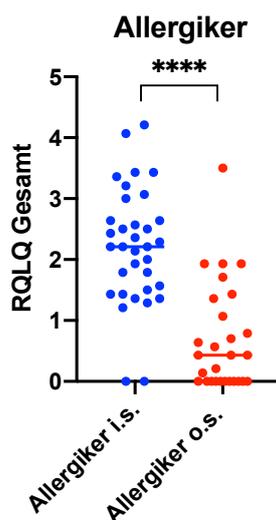
**Abbildung 4.1:** Vergleich des mRQLQ bei gesunden Kontrollen und allergischen Probanden mit und ohne SCIT während der IN-Season

Der mRQLQ Fragebogen wurde von jedem Probanden ausgefüllt um die individuellen Einschränkungen im Alltag und die Ausprägung der Symptome zu erfassen. Abbildung 4.1 zeigt, dass im Gesamtergebnis nur leichte Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Gruppen bestehen. Wenn jedoch eine Unterteilung in Rhinitiker mit und ohne Asthma vorgenommen wird, zeigt sich ein deutlicher Unterschied (Abbildung 4.2). Dieser Unterschied ist vor allem zwischen den Rhinitikern ohne SCIT mit der Kontrollgruppe ( $p= 0.0026$ ) und mit den Asthmatikern ohne SCIT ( $p= 0.0074$ ) zu sehen. Ein weiterer signifikanter Unterschied ist zwischen den Rhinitikern mit und ohne SCIT dargestellt ( $p = 0.0026$ ). Gesunde Probanden zeigten teilweise erhöhte mRQLQ-Werte weil sie Symptome im Rahmen einer stattgehabt leichten Erkältung oder allgemeine Symptome z.B. Ermüdung angegeben haben.



**Abbildung 4.2:** Darstellung der Stratifizierung nach Rhinitis und Asthma mit dem mRQLQ während der Pollensaison

Der mRQLQ wurde in den Wintermonaten erneut erhoben (siehe Anhang). Die mRQLQ Werte der IN- und OFF-Season wurden mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests verglichen. Probanden mit Allergien fühlen sich wie zu erwarten während der IN-Season deutlich stärker durch ihre allergische Erkrankung beeinträchtigt ( $p>0.0001$ )(Abbildung 4.3).

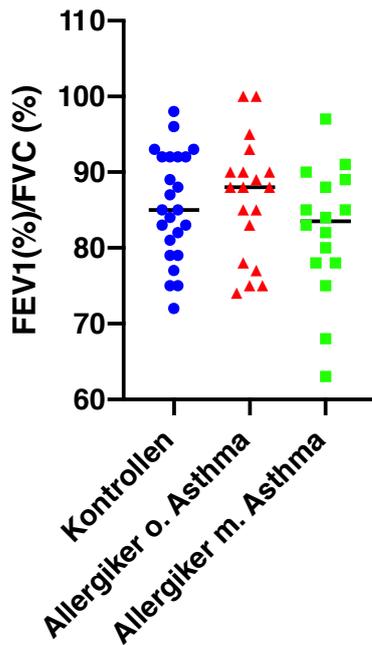


**Abbildung 4.3:** Vergleich des mRQLQ's bei Allergikern in der IN- und OFF-Season

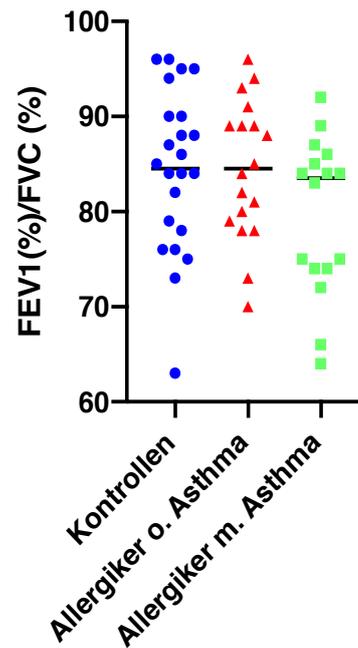
#### 4.2.4 Korrelation mit Lungenfunktionsdaten

Vor der Sputuminduktion wurde bei jedem Proband dreimal die Lungenfunktion bestimmt. Hierbei wurden die Vitalkapazität (FVC), die Einsekundenkapazität und die Mittlere Atemstromstärke bei noch 25% Vitalkapazität gemessen (MEF25). In der Übersichtstabelle (Tabelle 4.1) wird sichtbar, dass zwischen den Gruppen in der IN-Season nur geringe Unterschiede in den Werten der FVC, FEV1 und MEF25 sichtbar sind.

Auf der Basis dieser Werte wurde der Tiffeneau-Index berechnet. Dieser Parameter kann bei Obstruktion der Atemwege (z.B. beim Asthma Bronchiale) vermindert sein. Er wird aus der Vitalkapazität und der Einsekundenkapazität berechnet ( $FEV1\%/FVC\%$ ) und sollte im Normalfall über 75% liegen.



**Abbildung 4.4:** Zeigt den Vergleich des Tiffeneau-Index in den Verschieden Probandengruppen während der IN-Season



**Abbildung 4.5:** Zeigt den Vergleich des Tiffeneau-Index in den Verschieden Probandengruppen in der OFF-Season

Der Tiffeneau-Index wird in Abbildungen 4.4 und 4.5 im IN- und OFF-Season Vergleich dargestellt. Hier wird sichtbar, dass es, sowohl in der IN-Season als auch in der Off-Season keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Kontrollgruppe, den Allergikern mit und den Allergikern ohne Asthma gibt. Jeweils zwei Asthmatiker, in der IN-Season sowie in der OFF-Season lagen unter 70%. Dies spricht dann für ein unkontrolliertes Asthma. Ein Proband der Kontrollgruppe hatte auch einen auffälligen Tiffeneau-Index von unter 70%. Die Messung ist auf eine tagesabhängige mangelnde Compliance zurück zu führen. Während der IN-Season waren die Werte des Probanden im Grenzbereich bei 72%.

#### 4.2.5 Gesamtzellzahl im Sputum (Zellen pro mL)

Die Gesamtzellzahl oder auch Sputum-Cell-Load genannt wird als ein Marker der lokalen Entzündung bei Probanden mit Allergien angesehen. Die Auswertung der Gesamtzellzahl im Sputum in der IN-Season erbrachte, dass Probanden mit Allergischer Rhinitis ( $134.2 \pm 31.4$  [ $\times 10^4$ /mL] ) und allergischem Asthma ( $178.1 \pm 94.8$  [ $\times 10^4$ /mL]) ohne Immuntherapie die höchste Gesamtzellzahl hatten. Interessant ist die signifikant niedrige Gesamtzellzahl bei Probanden mit SCIT (Allergische Rhinitis mit SCIT: Gesamtzellzahl  $42.8 \pm 9.3$  [ $\times 10^4$ /mL], Asthma mit SCIT: Gesamtzellzahl  $19.6 \pm 2.9$  [ $\times 10^4$ /mL]).

#### 4.2.6 Prozentuale Zelldifferenzierung des Sputums in der IN-Season

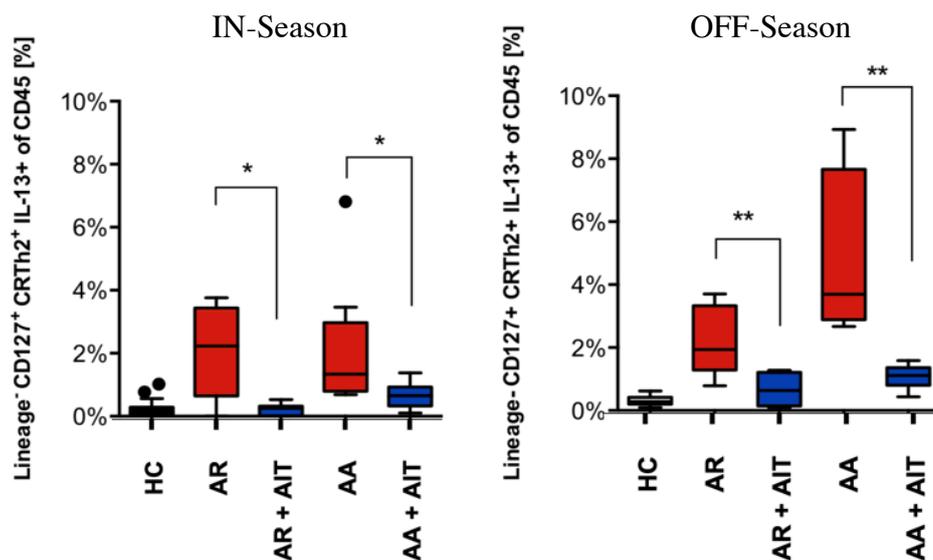
Zum Goldstandard der Sputumanalysen und Durchflusszytometrie gehört die mikroskopische Zelldifferenzierung. Bei der mikroskopischen Auswertung der Zytospins zeigte sich die in Tabelle 4.1 dargestellte prozentuale Zellverteilung in den verschiedenen Probandengruppen. Der prozentuale Anteil der Makrophagen liegt in allen Gruppen zwischen 80-87%. Eine Auswirkung der Immuntherapie ist der Abfall von Eosinophilen und mit ihnen ihrer ausgeschütteten pro-inflammatorischen Zytokine. Dieser Abfall wird hier sichtbar, da bei Probanden mit SCIT der Anteil an Eosinophilen-Zellen abfällt (Allergische Rhinitis mit SCIT:  $1.0\% \pm 0.2$ ; Allergisches Asthma mit SCIT:  $0.4\% \pm 0.2$ ) im Vergleich zu Probanden ohne SCIT (Allerg. Rhinitis ohne SCIT  $2.6\% \pm 1.0$ ; Allerg. Asthma ohne SCIT  $2.5\% \pm 1.5$ ).

## 4.3 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl der ILC2s mit Hilfe verschiedener Marker, intrazellulär und extrazellulär, dargestellt und mit anderen laborchemischen sowie klinischen Merkmalen korreliert.

### 4.3.1 Phänotypisierung der ILC2s im Sputum: Lokale Immunantwort

Um die ILC2s im Sputum und im Blut zu vergleichen wurde ein Gruppentest mittels Kruska-Wallis Testung durchgeführt. Nur wenn dieser auch signifikant war, wurden Einzeltestungen mittels dem unpaired Mann-Whitney Test angeschlossen.



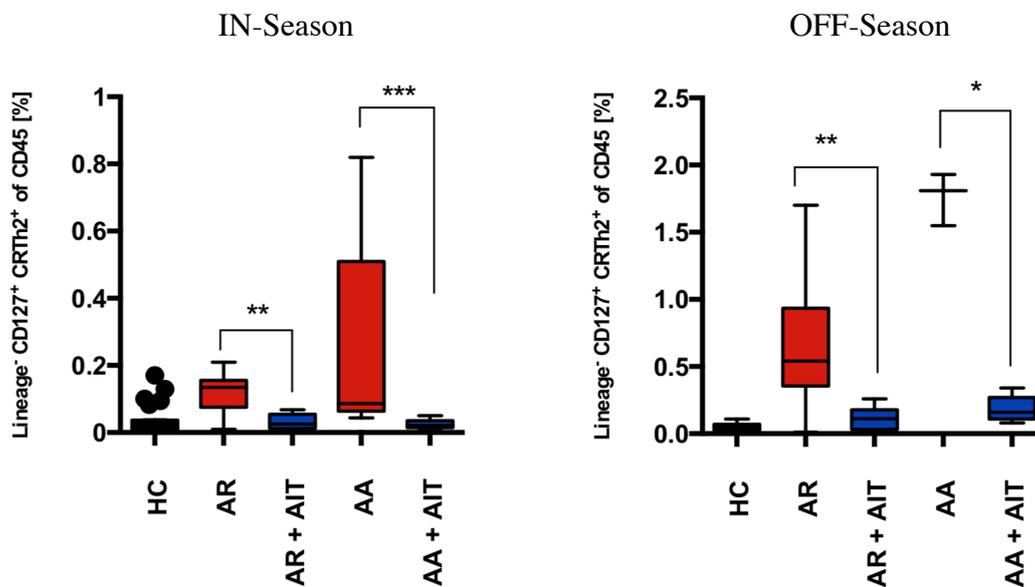
**Abbildung 4.6:** Phänotypisierung der ILC2s im Sputum in der IN- und der OFF-Season

Abbildung 4.6 zeigt im Vergleich die prozentualen Anteile der ILC2s im Sputum in der IN- und OFF-Season. Drei Schlüsse sind daraus zu ziehen.

1. Es zeigen sich signifikante Unterschiede der Prozentzahl der ILC2 bei Probanden mit Allergischer Rhinitis und mit Asthma ohne SCIT im Vergleich zu Probanden mit absolvierter Immuntherapie (IN-Season  $p < 0.05$ , OFF-Season  $p < 0.01$ ).

2. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der prozentualen Anteile der ILC2s, bei Probanden mit Rhinitis und Asthma ohne Therapie.
3. In der OFF-Season sind bei Asthmatikern, mehr ILC2s im Sputum Nachweisbar als in der Allergensaison.

#### 4.3.2 Phänotypisierung der ILC2s im Blut (PBMC): Systemische Immunantwort



**Abbildung 4.7:** Phänotypisierung ILC2 im Blut in der IN- und OFF-Season

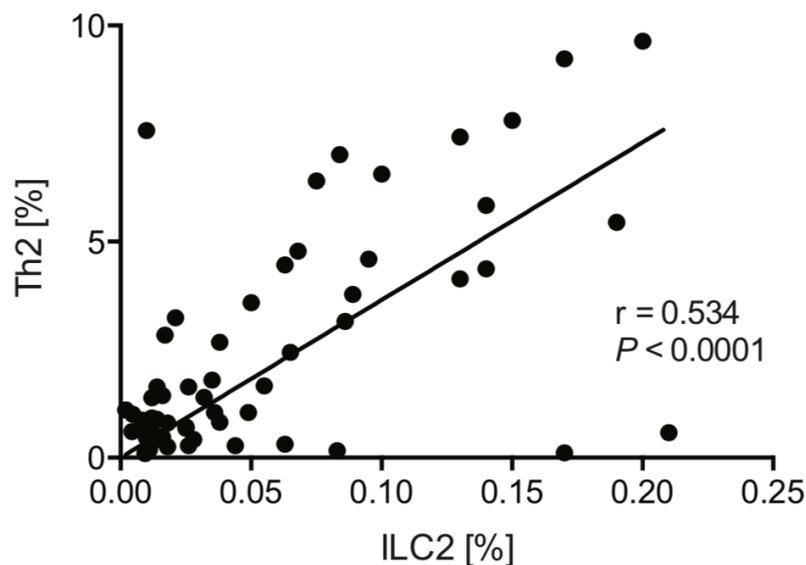
Abbildung 4.7 zeigt im Vergleich die prozentualen Anteile der ILC2s im Blut in der IN- und OFF-Season. Die Auswertung lässt es zu vier Schlussfolgerungen daraus zu ziehen.

1. Der Unterschied der prozentualen Zellzahl zwischen Probanden mit allergischem Asthma und SCIT im Vergleich zu Probanden ohne SCIT, ist in der Systematischen Immunantwort noch signifikanter ( $P < 0.001$ ) als in der lokalen Antwort.

2. Bei Probanden mit allergischer Rhinitis ist auch eine signifikante systemische Reduktion nach Therapie, in der IN- und in der OFF-Season sichtbar ( $P < 0.01$ ).
3. Zu beiden Beobachtungszeiträumen gab es systemisch mehr ILC2s bei Probanden mit Asthma im Vergleich zu allergischer Rhinitis.
4. Es werden auch systemisch mehr ILC2s in der OFF-Season bei Probanden mit Asthma und Rhinitis beobachtet als in der IN-Season (AA: 1.75%, AR: 0.75%).

#### 4.3.3 Korrelation zwischen ILC2 und TH2 Zellen im Sputum

In der Pathophysiologie von Typ-1 allergischen Reaktionen werden TH2 Zellen eine wichtige Rolle zugeordnet. Es wurden die neuen Akteure, die ILC2s, mit dieser bekannten Reaktion des Körpers, korreliert. Sichtbar wird eine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentanteil beider Zelltypen ( $r = 0.534$ ,  $P < 0.0001$ ).



**Abbildung 4.8:** Korrelation ILC2 (%) und TH2 (%) Zellen im Sputum

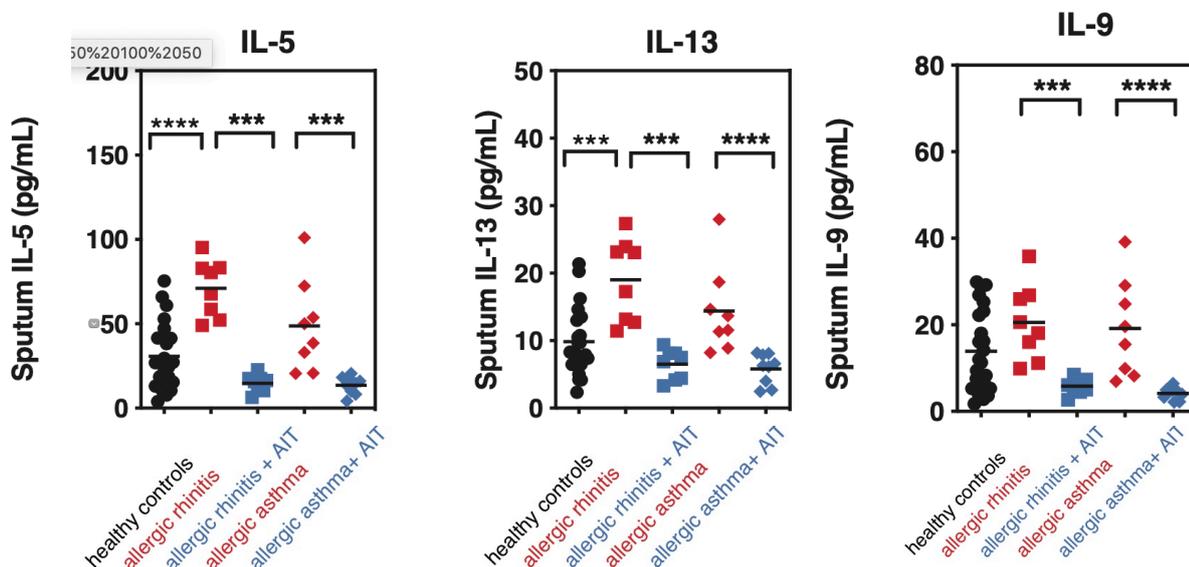
### 4.3.4 Sputum Zytokinlevel

Tabelle 4.2: Sputum Zytokinlevel (Mean +/- SEM)

	Kontrollen	Allergische Rhinitis ohne SCIT	Allergische Rhinitis mit SCIT	Allergisches Asthma ohne SCIT	Allergisches Asthma mit SCIT
<b>IL-5 (pg/mL)</b>	30.8±3.9	71.2±5.9****	14.8±1.8###	48.8±9.7	13.6±1.7\$\$\$
<b>IL-9 (pg/mL)</b>	13.9±1.9	20.6±3.1	5.8±0.6###	19.2±4.0	4.2±0.5\$\$\$
<b>IL-13 (pg/mL)</b>	9.8±1.0	19.0±2.2***	6.5±0.8###	14.4±2.3	5.8±0.7\$\$\$\$

\* zeigt die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe; # zeigt die statistische Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Probanden mit allergischer Rhinitis; \$ zeigt die statistische Signifikanz im Vergleich zu Probanden mit unbehandeltem allergischem Asthma

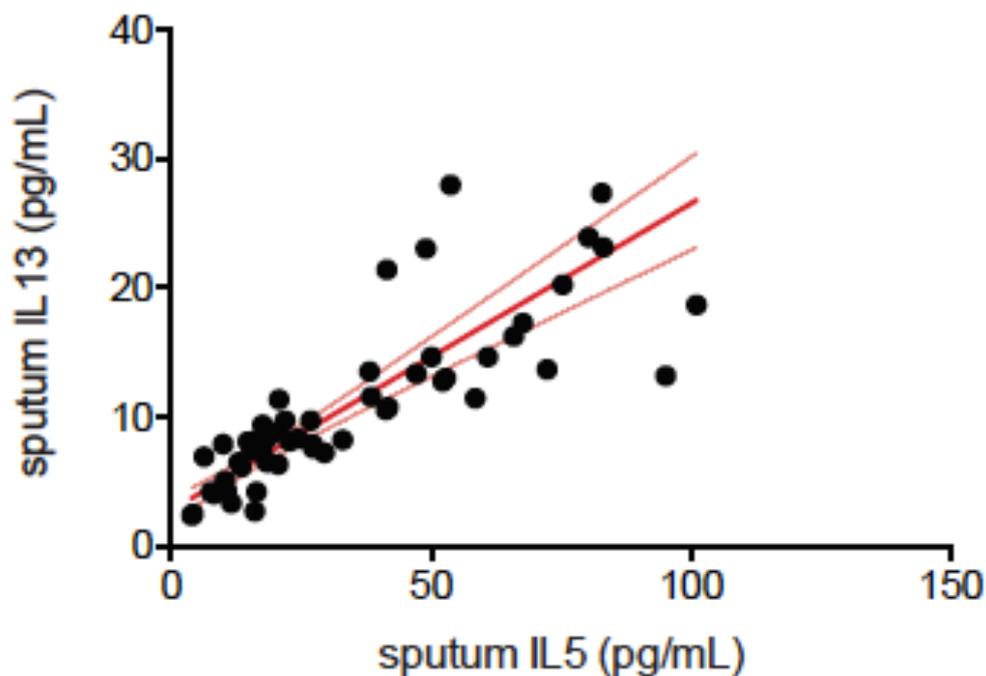
Die Spiegel der Zytokine IL-5, IL-9 und IL-13 assoziiert mit ILC2s waren erhöht in unbehandelten Probanden im Vergleich zu behandelten Probanden mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma (Abbildung 4.9 und 4.10)



**Abbildung 4.9:** IL-5, IL-13 und IL-9 Level im Sputum von Probanden mit Asthma und allergischer Rhinitis mit oder ohne Immuntherapie und gesunden Kontrollen.

#### 4.3.5 Intraorgan (Sputum) Korrelation von IL-5 und IL-13

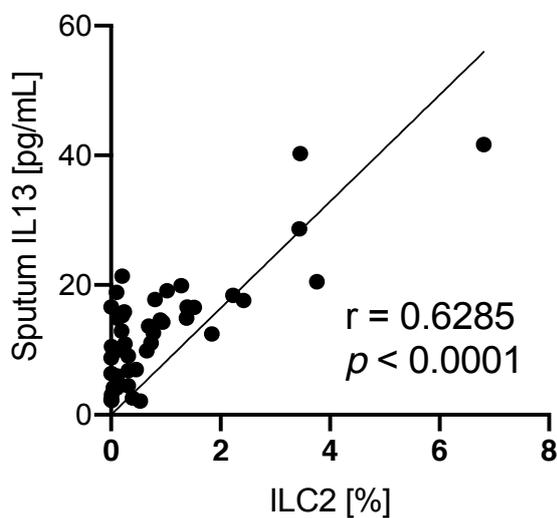
Nach der signifikanten Korrelation der Prozentualanteile von ILC2 und TH2 Zellen im Sputum wurden zwei der TH2 assoziierten Typ 2 Biomarker (IL-5 und IL-13) korreliert (Abb. 4.11). Diese werden auch nach einer Allergenstimulation von ILC2 ausgeschüttet. ILC2s werden als die Hauptproduzenten von IL-13 beschrieben. Mittels IL-13 werden TH2-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen rekrutiert (Maggi et al., 2017). Durch IL-5 wird die Produktion von eosinophilen Zellen stimuliert und ihr Abbau reduziert (Mjosberg and Spits, 2016). Bei hohem IL-5 Werten im Sputum ist auch IL-13 erhöht.



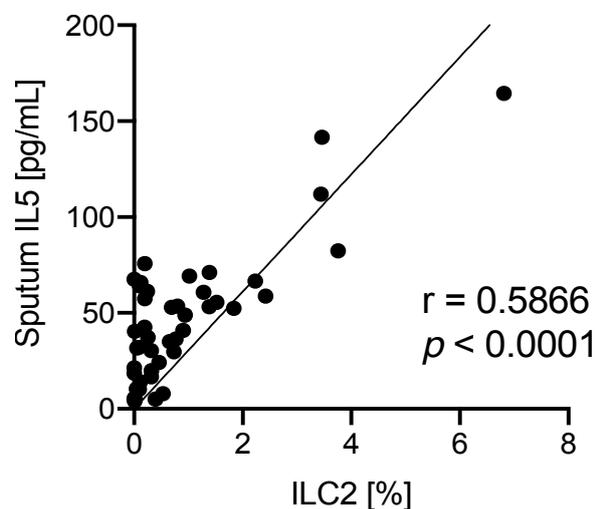
**Abbildung 4.10:** Korrelation IL-5/IL-13 (pg/mL) im Sputum

#### 4.3.6 Korrelation von IL-5 und IL-13 mit ILC2 im Sputum

Im Sputum unseres Probandenpools lies sich eine Korrelation zwischen IL-5 und IL-13 mit ILC2s signifikant nachweisen. Wenn ILC2 tatsächlich als Hauptproduzenten dieser Biomarker anzusehen ist sollte auch hier eine signifikante Korrelation nachweisbar sein. Der Spearman-Korrelationskoeffizient betrug jeweils  $p < 0.0001$  und der R-Wert lag bei 0.63 bzw. 0.59. Somit ist die Signifikanz der Korrelation von ILC2s mit IL-5/IL-13 anzunehmen.



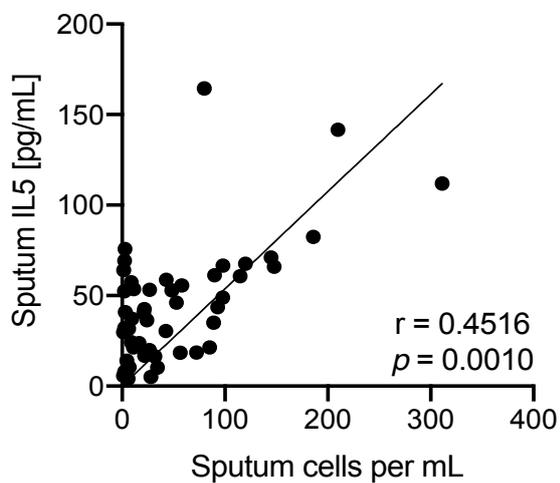
**Abbildung 4.11:** Korrelation Sputum IL-13 (pg/mL) und ILC2 (%)



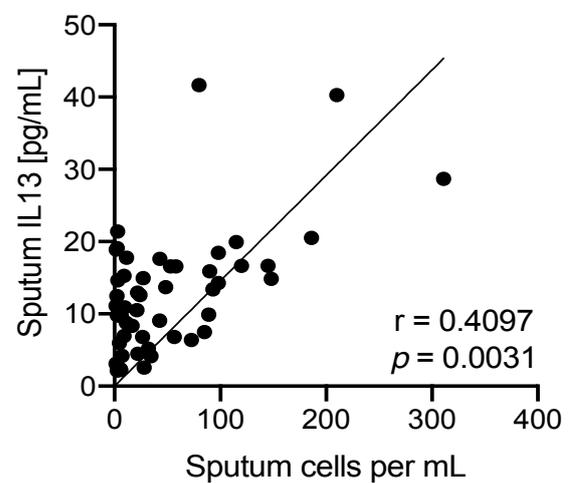
**Abbildung 4.12:** Korrelation Sputum IL-5 (pg/mL) und ILC2 (%)

#### 4.3.7 Sputum-Cell-Load Korrelation mit IL5 und IL13

Die Gesamtzellzahl pro ml, die Sputum-Cell-Load, wird als Entzündungsmarker in der lokalen allergischen Reaktion betrachtet. IL5 und IL13 sind ausschlaggebend für die lokale allergische Reaktion und wurden daher mit der Sputum-Cell-Load korreliert. Die Sputumzellzahl pro mL und der Nachweis von IL-13/IL-5 im Sputum korreliert schwach signifikant (Sputum IL-13  $r = 0.4097$   $p = 0.0031$  / IL-5  $r = 0.4516$   $p = 0.0010$ ).

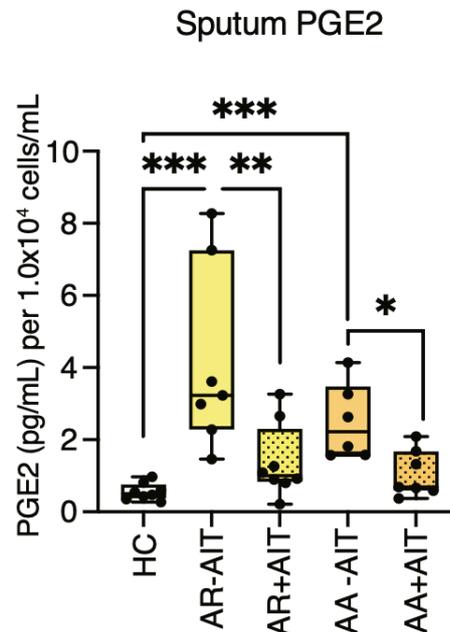


**Abbildung 4.13:** Korrelation Sputum-Cell-Load mit Sputum IL-5 (pg/mL)



**Abbildung 4.14:** Korrelation Sputum-Cell-Load mit Sputum IL-13 (pg/mL)

#### 4.3.8 Analyse von PGE2 im Sputum

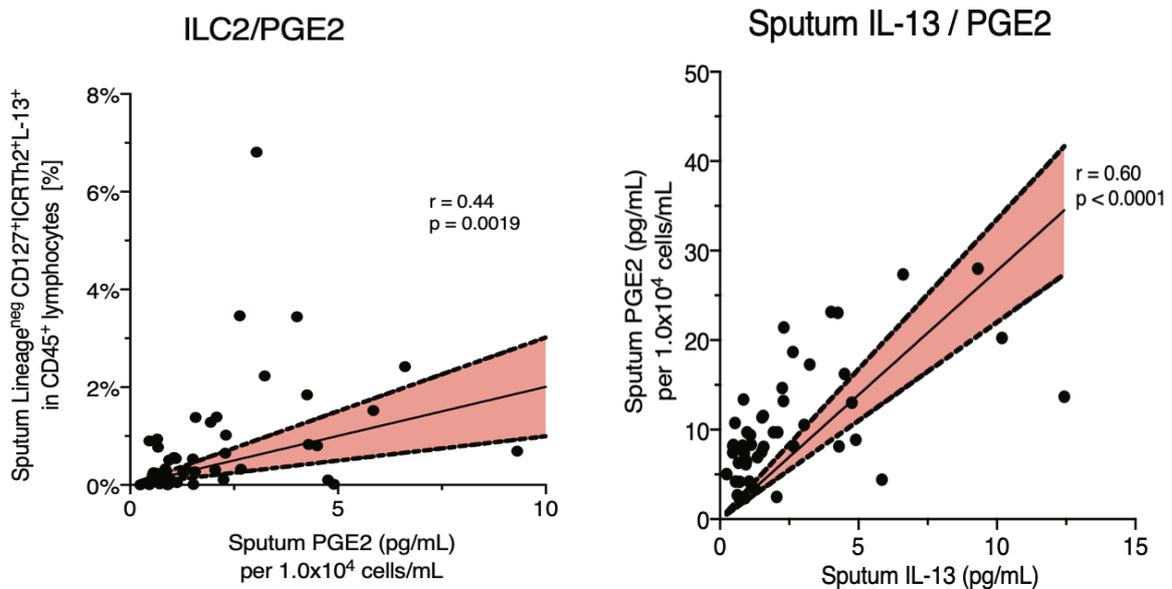


**Abbildung 4.15:** PGE2 (pg/ml) im Sputum von Probanden mit Asthma und allergischer Rhinitis mit oder ohne Immuntherapie und gesunden Kontrollen.

Prostaglandin E2 (PGE2), übt je nach Gewebe und Umgebungsbedingungen eine pro- oder anti-inflammatorische Wirkung über seine vier Rezeptoren (EP1-EP4) aus. Bisher wird eine regulatorische Funktion in allergischen Erkrankungen zugeschrieben. Die Daten zeigen, dass bei Probanden mit allergischem Asthma und allergische Rhinitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen die PGE2 Level im Sputum deutlich erhöht sind. Hinzukommt, dass es bei behandelten Probanden zu einer signifikanten Verringerung des PGE2 im Sputum kommt.

### 4.3.9 Korrelation von Sputum PGE2 mit ILC2 und IL-13

Die angenommene regulatorische Funktion von PGE2 wird vor allem über die verringerte Produktion der Typ 2 Zytokine, IL-5 und IL-13 durch ILC2s angenommen (Maric et al., 2018). In Abbildung 4.17 konnte eine moderate Korrelation zwischen Sputum PGE2 und Sputum ILC2s gezeigt werden ( $r = 0.44$ ,  $p = 0.0019$ ). In Abbildung 4.18 wird eine signifikante Korrelation zwischen Sputum IL-13 und PGE2 dargestellt ( $r = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ ).

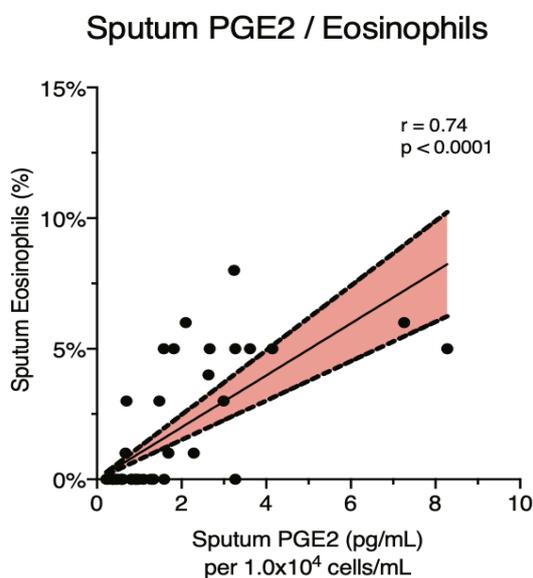


**Abbildung 4.16:** Korrelation von ILC2 und PGE2 im Sputum

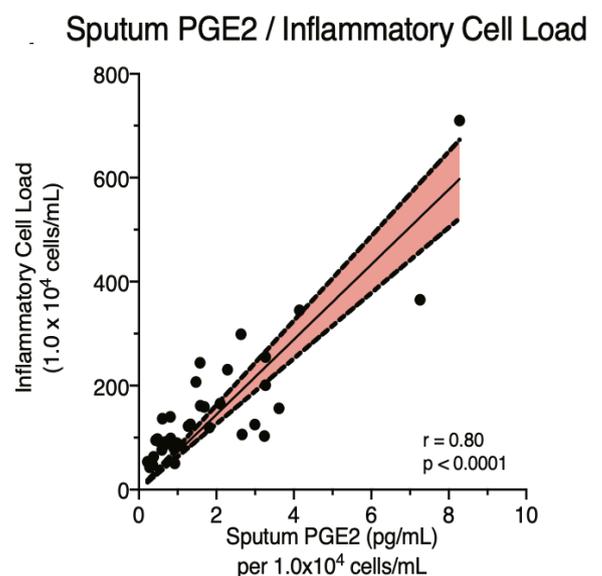
**Abbildung 4.17:** Vergleich von Sputum IL-13 mit PGE2

#### 4.3.10 Sputum PGE2 in Korrelation mit Eosinophilen und Sputum Cell Load (Inflammatory Cell Load)

Abbildung 4.19 und 4.20 stellen eine signifikante Korrelation zwischen Sputum PGE2 und zwei inflammatorischen sowie allergischen Markern dar (eosinophilen Zellen  $r = 0.7$ ,  $p < 0.0001$ , Sputum Cell load  $r = 0.8$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Abbildung 4.18:** Sputum PGE2 in Korrelation mit Sputum Eosinophilen

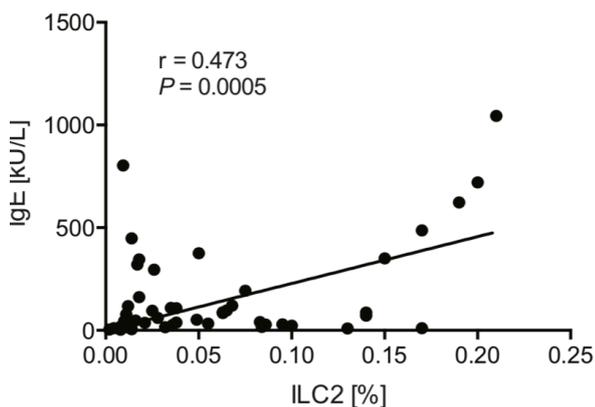


**Abbildung 4.19:** Sputum PGE2 in Korrelation mit Sputum Cell Load

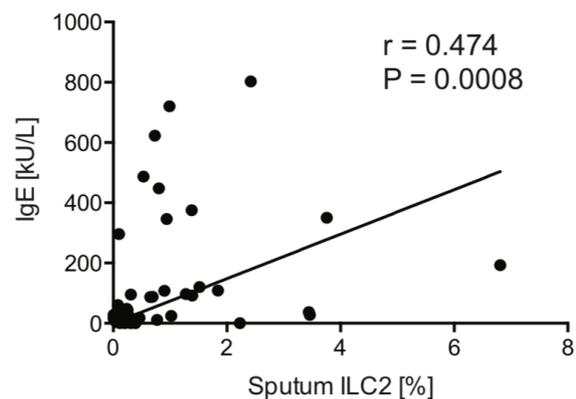
## 4.4 Korrelation mit klinischen Daten

Im Folgenden werden die ILC2s mit relevanten Parametern und klinischen Symptomen verglichen. Aus den Daten die während der Pollenbelastung (IN-Season) erhoben wurden, wurde als klinisch wichtigster Parameter das Gesamt-IgE mit den ILC2s jeweils im Blut und im Sputum korreliert. Die klinische Symptombelastung erfassen wir mittels des mRQLQ Gesamtscores und korrelierten auch diesen mit der ILC2-Belastung im Sputum und im Blut.

### 4.4.1. Korrelation IgE mit ILC2s-lokal und Systemisch



**Abbildung 4.20:** Korrelation IgE (kU/L) und ILC2 (%) im Blut

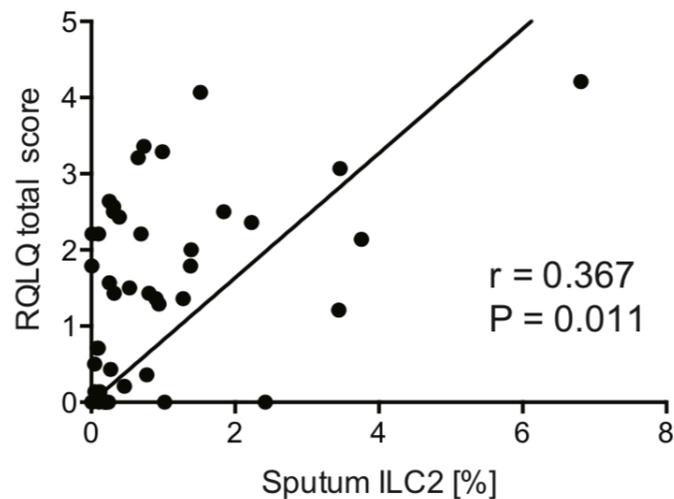


**Abbildung 4.21:** Korrelation IgE (kU/L) mit ILC2 (%) im Sputum

Die Abbildungen 4.21 und 4.22 verdeutlichen, dass die ILC2s sowohl im peripheren Blut als auch im Sputum mit dem Gesamt-IgE-Spiegel signifikant korrelieren (Spearman-Korrelationskoeffizient  $r = 0.473$  (Abb 4.21.),  $r = 0.474$  (Abb 4.22)  $p^{***} p < 0.001$ )

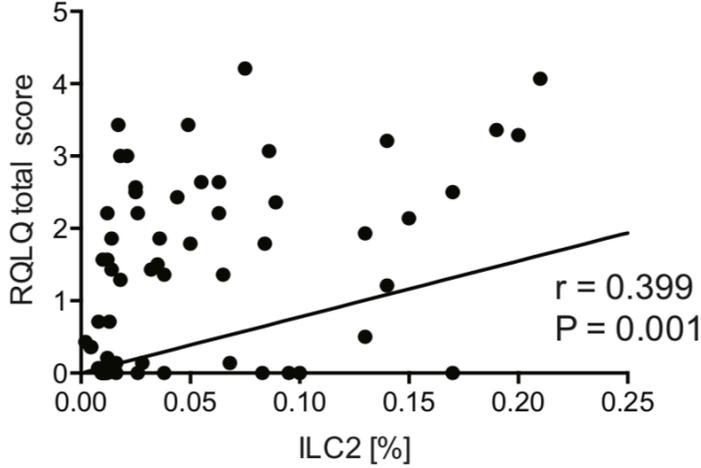
#### 4.4.2 Korrelation mRQLQ mit ILC2s- lokal und Systemisch

Der mRQLQ Gesamtscore stellt die Symptombelastung der allergischen Krankheit für den Probanden dar. In Abbildung 4.23 wird der mRQLQ mit den ILC2s in der lokalen Immunantwort, im Sputum, korreliert. Die Korrelation fällt hier nur milde aus (Spearman-Korrelationskoeffizient  $r = 0.367$ ,  $P < 0.05$ ).



**Abbildung 4.22:** Korrelation mRQLQ Gesamtscore mit Sputum ILC2 (%)

Auch die Korrelation von ILC2s im peripheren Blut mit dem mRQLQ-Gesamtscore, als Ausdruck der Symptombelastung, ist signifikant (Spearman- Korrelationskoeffizient  $r=0.399$ ,  $p > 0.001$ ).

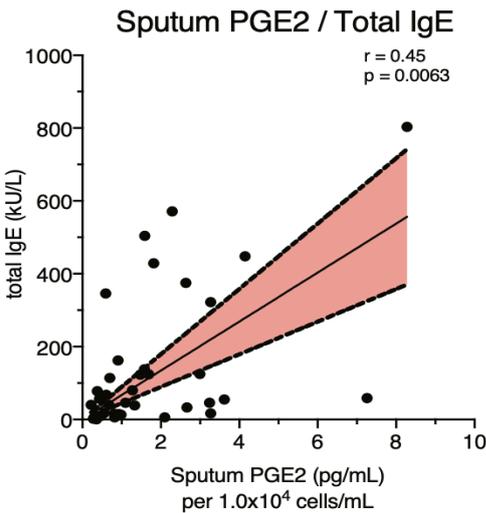


**Abbildung 4.23:** Korrelation mRQLQ Gesamtscore mit ILC2 (%) im Blut

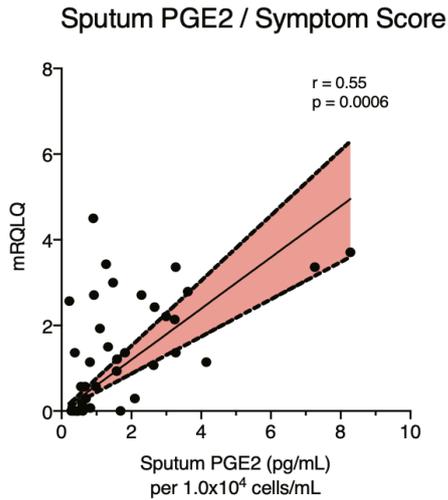
4.4.3 Korrelation von Sputum PGE2 mit klinischen Daten

Die klinischen Parameter, gesamt IgE und mRQLQ Gesamtscore zeigen eine signifikante Korrelation mit Sputum PGE2 (Abbildung 4.25 und 4.26).

Beides sind klinische Marker die für eine pro-inflammatorische Wirkung von PGE2 sprechen.



**Abbildung 4.24:** Korrelation zwischen PGE2 und Total IgE



**Abbildung 4.25:** Korrelation zwischen PGE2 und dem mRQLQ Gesamtscore

## **5. Diskussion**

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Darstellung und Quantifizierung der Typ 2 Innaten Lymphoid Zellen mittels Durchflusszytometrie, im direkten Vergleich zwischen Probandengruppen in der IN- und der OFF-Season und zwischen zwei Kompartimenten (lokal in der Lunge vs. Peripher im Blut). Ausgangspunkt dieser Arbeit in ihrer Durchführung und Methodik ist die in 2012 veröffentlichte Arbeit von Dr. Zissler. Die Protokolle zur Sputuminduktion und der Sputumaufbereitung, die durch die Arbeit von Dr. Zissler generiert wurden, wurden auch hier benutzt um eine vergleichbare hohe Qualität zu erreichen.

Ein wichtiger Marker für die Qualität des Sputums ist der Anteil an Plattenepithelzellen und der Anteil an lebenden Leukozyten. Wenn auch in der IN-Season der Anteil an toten Leukozyten bei 30 % lag, konnten wir dennoch eine hohe Qualität an Sputum erreichen, da in der IN- und OFF-Season nur eine geringe Anzahl an Plattenepithelzellen nachweisbar war. Es kam zu einer deutliche Verbesserung der Umsetzung der SOPs. Somit konnten in der IN-Season 94,9 % lebende Leukozyten im Sputum analysiert werden.

Es wurden verschiedene klinische Daten verarbeitet um einen Zusammenhang zwischen den ILC2s und der Klinik allergischer Erkrankungen herzustellen. Im Vergleich der Gesamt-IgE Werte im Blut fiel ein deutlicher Unterschied bei Allergikern mit und ohne Immuntherapie auf. Somit stimmen die Daten mit der aktuellen Studienlage überein. Akdis (2015) und Van der Valk (2015) beschreiben ebenfalls eine Verminderung von IgE im Blut im Rahmen einer Immuntherapie (Akdis and Akdis, 2015, van der Valk et al., 2015). IgE ist ausschlaggebend für die Pathophysiologie einer allergischen Typ 1 Reaktion. Die Reduktion der IgE-Werte ist als wichtiger Marker für den Erfolg einer Immuntherapie zu betrachten. Durch ein Grading der IgE-Werte könnte in Zukunft ein Cut-Off Wert gefunden werden, ab dem eine Therapie als erfolgreich einzustufen ist.

Mittels des mRQLQ Fragebogen konnten wir bestätigen, dass es bei Allergikern zu einer deutlichen Symptombesserung außerhalb der Pollensaison kommt. Diese klinischen Daten waren nicht signifikant abhängig von einer zuvor durchgeführten Immuntherapie. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Immuntherapie zu einer Symptombesserung bei Probanden mit allergischer Rhinitis führt.

In unserem Probandenkollektiv konnte ein Abfall des Tiffeneau-Wertes, wie er bei Asthmatikern in der Literatur beschrieben wird, nicht nachgewiesen werden. Dieser Abfall fiel in unseren Daten deutlich milder aus. Nur bei zwei Asthmatikern mit schwerem Asthma lag der Tiffeneau-Wert unter 70%. Wir erklären diesen Trend damit, dass die meisten unserer Probanden jung und ihr Asthma gut kontrolliert war. Dennoch wiesen die Allergiker als Zeichen einer ausgeprägten Immunreaktion eine Erhöhung der Gesamtzellzahl oder Inflammatory Cell Load auf. Die Gesamtzellzahl (Sputumzellen/ml), als Ausdruck einer verstärkten Entzündungsreaktion und somit Symptomlast, war bei den Allergikern ohne Immuntherapie mehr als doppelt so hoch. Die Sputuminduktion ist als Momentaufnahme der lokalen Entzündungsreaktion zu betrachten

In den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen sind die ILC2s mit ihrer Rolle für die Pathophysiologie allergischer Reaktionen gerückt. Ihnen wird eine „Wärter“ Funktion zugeschrieben, da sie stets der Antigen-spezifischen Immunantwort vorausgehen (Halim et al., 2016). Sie produzieren große Mengen an Zytokinen, wie IL5 und IL13 und treiben somit den Inflammationsprozess voran. Die vorliegende Arbeit ermöglicht eine Analyse der Typ 2 Innaten Lymphoid Zellen in ihren Kompartimenten (Lokal und Systemisch) und in Relation zur Allergenexposition. Da die ILC2s noch am Anfang ihrer wissenschaftlichen Analyse stehen, werden sie auch in der aktuellen Studienlage meist separat in diesen beiden Kompartimenten beschrieben. Die Daten ermöglichen es einen direkten Vergleich dieser beiden Kompartimente herzustellen. Die ILC2s wurden für die Gating-Strategy dieser Studie als CD45+Lin-CD127+CRTH2+ definiert. Diese Oberflächenmarker, werden in der Literatur am häufigsten eingesetzt. Für die Zukunft erscheint es wichtig, dass eine universelle Gating-Strategy für die ILC2s definiert wird, da es bei unterschiedlichen Ansätzen zu methodisch bedingten Abweichungen kommen kann.

Wie zu erwarten, stellten sich bei Probanden mit Allergien deutlich mehr ILC2s im Sputum und im Blut dar als bei den gesunden Kontrollprobanden. Dies stimmt mit der Studienlage überein (Kim et al., 2019). Anders aber, als in der Arbeit von Kim et al. (2019), beobachteten wir Unterschiede in der Anzahl von ILC2s bei Asthmatischer im Vergleich zu Probanden mit allergischer Rhinitis. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von ILC2s nicht nur in der Pathogenese von lokalen Lungenerkrankungen, sondern auch anderen allergischen Erkrankungen wie der allergischen Rhinitis. Kim et al. (2019) fanden auch andere Subtypen von ILCs (ILC1 und ILC3) im Sputum von Asthmatikern. Die genaue Aufgabenverteilung dieser Verschiedenen ILCs (ILC 1-3) sind bisher nicht geklärt.

Bei Allergikern mit Immuntherapie finden sich im Gegensatz zu Allergikern ohne Immuntherapie eine verminderte Anzahl an ILC2s im Blut und im Sputum. Dieser Unterschied ist besonders eindrücklich im Blut von Probanden mit allergischem Asthma. Dies wird von der Literatur bestätigt (Lao-Araya et al., 2014)(Akdis and Akdis, 2015). Diese Autoren fanden, dass ILC2s im Blut während der Pollensaison bei Probanden mit SCIT verringert waren und gehen davon aus, dass dies durch die Induktion von IL-10+ regulatorischen T-Zellen, ein etablierter Mechanismus der Immuntherapie, ausgelöst wird. Dies ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht in weiteren Studien gefestigt. Im Gegensatz zu unserer Studie wurde hier in der Durchflusszytometrie Vollblut und nicht PBMCs als Grundlage genommen (Lao-Araya et al., 2014). Lombardi et al. (2016) beobachtete in einer Doppelblindstudie keinen Unterschied in der Anzahl von ILC2s vor und nach Immuntherapie (Lombardi et al., 2016). Die Immuntherapie wurde hier jedoch nur für 4 Monate durchgeführt. Da die Standardimmuntherapie über 3 Jahre angesetzt wird, erscheint uns der Therapiezeitraum nicht ausreichend lang um die Studien vergleichbar zu machen.

Der Rückgang der Zytokine IL-5, IL-9 und IL-13 im Sputumüberstand sind ein Mass für die mögliche Verminderung der ILC2s durch eine Immuntherapie bei Probanden mit allergischem Asthma und allergischer Rhinitis. Dieser Rückgang durch eine Immuntherapie konnte für IL-5, IL-9 und IL-13 in den allergischen Probandengruppen mit Immuntherapie dargestellt werden. Es zeigte sich auch eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an ILC2s und der Zytokine IL-5/IL-13. Eine Verringerung der ILC2s und der mit ihnen assoziierten Zytokine durch eine Immuntherapie kann zu einer Reduzierung der allergischen Symptombelastung führen. Diese Symptombelastung der Allergiker kann mittels des mRQLQ-Scores erfasst werden. Sowohl mit der lokalen Reaktion (Sputum) als auch mit der systemischen Reaktion (Blut) korrelierte der mRQLQ-Score signifikant mit der Anzahl der ILC2s. So kann die Wirksamkeit einer Immuntherapie auf die Symptombelastung in der Behandlung allergischer Rhinitis und allergischen Asthma, auch bei einer möglichen verminderten Steroidsensitivität der ILC2s, unterstrichen werden (Jia et al., 2016).

ILC2s wurden im Sputum und im Blut vermehrt in der OFF-Season im Vergleich zur IN-Season nachgewiesen. Dies stimmt nicht mit den Daten von Akdis (2015) und Lombardi et al. (2016) überein, die eine Erhöhung der ILC2s im Blut während der Pollensaison fanden ( Akdis and Akdis, 2015) (Lombardi et al., 2016). Die von uns gefundenen erhöhten ILC2 Werte im Sputum könnten durch virale Trigger erklärt werden. Diese sind in den Wintermonaten präsent. Hinzukommt, dass in der IN-Season die Ergebnisse einer Lernkurve in der Umsetzung von SOPS (Zißler, 2012) geschuldet sein können. Im Blut hingegen ist eine Erklärung durch sogenanntes venöses Pooling möglich. Salter et al (2019) und Chen et al. (2017) konnten zeigen, dass die ILC2s nach

Allergenexposition innerhalb der ersten 24h aus der systemischen Circulation in die Atemwege wandern (Chen et al., 2017, Salter et al., 2019). In diesem Zeitraum sinkt die Anzahl der ILC2s im Blut. Fällt in der OFF-Season die Allergenexposition weg, werden weniger ILC2s lokal gebraucht und verbraucht.

ILC2s konnten als Zellgruppe identifiziert werden, die die Fähigkeit haben TH2 Zytokine wie IL5 und IL13 zu produzieren (Aron and Akbari, 2017). Wegen dieser Fähigkeit wurden ILC2s und TH2-Zellen korreliert. Es zeigte sich eine deutlich positive Korrelation, die als Beispiel für die Interaktion der beiden Zelltypen gelten kann. In vorangegangenen Studien konnte bereits dargestellt werden, dass ILC2s essentiell für die Sensibilisierung der T-Zellen und der Propagierung einer allergischen Erkrankung sind (Moldaver et al., 2017). In einem weiteren Schritt wurde die Korrelation der ILC2s mit IL5/IL13 analysiert. Smith et al. beschreiben, dass ILC2s im Blut und im Sputum mehr dieser Zytokine bilden als CD4+ Lymphozyten (Smith et al., 2016). Die stark signifikante ( $p < 0.0001$ ) Korrelation von ILC2 mit IL13 und IL5 im Sputum unserer Studie bestätigte die Ergebnisse von Smith et al. (2016), dass ILC2s wichtig für die Produktion von IL5 und IL13 sind. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Asthma nicht nur eine TH2-abhängige Reaktion zugrunde liegt. Auch der angeborene Signalweg über ILC2 und Ausschüttung von IL5/IL13 scheint eine wichtige Rolle zu spielen, denn sie leiten die adaptive immunologische Typ-2 Antwort ein (Smith et al., 2016). Eine Funktion der beiden Zytokine (IL5/IL13) liegt in der Rekrutierung anderer Zellen. IL13 stimuliert Makrophagen, TH2- und Dendritischen- Zellen und IL5 führt zur Steigerung der eosinophilen Zellen (Maggi et al., 2017). Das Resultat ist dann eine Erhöhung der Gesamtzellzahl pro ml und auch in den vorliegenden Daten konnte eine signifikante Korrelation von IL5 ( $p = 0.0010$ ) und IL13 ( $p = 0.0031$ ) mit dem Sputum-cell-load nachgewiesen werden.

Prostaglandin E2 (PGE2), ein Metabolit der oberen Atemwege, übt je nach Gewebe und Umgebungsbedingungen eine pro- oder anti-inflammatorische Wirkung über seine vier Rezeptoren (EP1-EP4) aus. Initial wurde vor allem der bronchodilatatorische Effekt von PGE2 durch Inhibition der Muskelzellen und Mastzellen beschrieben (Ren et al., 1995). Im Bezug auf die ILC2s wird in vorangegangenen Studien Prostaglandin E2 als einen in erster Linie hemmender Regulator der ILC2s beschrieben. Die Inhibierung findet über die GATA 3 Expression und somit Produktion der Typ 2 Zytokine (IL5 und IL13) statt (Maric et al., 2018). Maric und Mitarbeiter konnten diese Inhibierung der ILC2s, die aus Tonsillen und aus peripherem Blut gewonnen wurden, darstellen (Maric et al., 2018). Zhou und Mitarbeiter (2018) zeigten darüber hinaus auch, dass EP2 und EP4 Rezeptoren auf den ILC2s vorhanden sind und entscheidend für die Vermittlung der Inhibition der ILC2s sind

(Zhou et al., 2018). Der Effekt von Prostaglandin E2 über den EP3 Rezeptor ist noch nicht ausreichend analysiert. In der vorliegenden Studie wurde eine signifikant positive Korrelation zwischen PGE2 und ILC2 sowie IL13 im Sputum nachgewiesen. Das weist auf eine inflammatorische Wirkung hin. Die bisherige Studienlage ging aufgrund verringerter Proliferation und Produktion der Typ 2 Zytokine von einer anti-inflammatorischen Wirkung aus (Maric et al., 2018, Zhou et al., 2018).

Es gelang der Nachweis von Prostaglandin E2 im Sputum von Probanden mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma. Diese Erhöhung gegenüber gesunden Probanden wurde auch von Aggarwall et al. (2010) bei Probanden mit milden bis schwerem Asthma gezeigt (Aggarwal et al., 2010). Die erbrachten Daten zeigen, dass PGE2 nicht nur eine Funktion bei allergischem Asthma in der Lunge, sondern auch in der Nase bei der allergischen Rhinitis hat. Bei Probanden mit allergischem Asthma und allergischer Rhinitis, die mittels einer Immuntherapie behandelt wurden, war die Reduzierung des Prostaglandin E2 deutlich. Eine Reduzierung der PGE2 durch Immuntherapie wurde von Lech et al. (2016) ebenfalls nachgewiesen. Sie analysierten den PGE2 Spiegel im Blut bei Probanden, die sich einer Immuntherapie mit Wespengift unterzogen hatten und wiesen einen Abfall von PGE2 nach 6 Monaten Immuntherapie nach (Lech et al., 2016). Die vorliegenden Ergebnisse werden als Hinweis auf eine pro-inflammatorische Wirkung des PGE2 bei allergischem Asthma und allergischer Rhinitis gewertet. In noch nicht veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe wird eine mögliche pro-inflammatorische Wirkung über den EP3 Rezeptor beschrieben. Diese beschreiben auch eine Reduzierung der Transkription von EP3 und somit PGE2 durch eine Immuntherapie. Gestützt wird die Annahme einer pro-inflammatorischen Wirkung auch dadurch, dass PGE2 positiv mit den klinischen Markern, Inflammatorischer Cell Load, Eosinophile im Sputum und der Symptombelastung (mRQLQ) korreliert. Diese klinischen Marker spiegeln ein inflammatorisches Geschehen wieder. In Zusammenschau der Daten aus der Arbeitsgruppe könnte der pro-inflammatorische Signalweg über EP3 und PGE2 durch eine Immuntherapie gehemmt werden und somit zu einer Reduzierung der klinischen und symptomatischen Marker führen. Dies könnte einen neuartigen, entscheidenden Mechanismus der Immuntherapie darstellen.

Die vorliegende Arbeit setzte sich zum Ziel eine genaue Identifizierung der Innaten Typ 2 Lymphoid Zellen in den verschiedenen Kompartimenten, in Abhängigkeit von saisonalen Einflüssen (IN/OFF-Season) und gegebenenfalls vorangegangener Immuntherapie bei Probanden mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma, durchzuführen. Schwankungen des Pollenflugs und die natürliche Exposition erschweren die Stratifizierung des Probandenkollektivs und machen eine gute Kontrolle nicht möglich. Dennoch gelang der Nachweis, dass die ILC2s wichtige Mitspieler,

zu Beginn einer allergischen Reaktion und auch für die weitere Propagierung einer allergischen Rhinitis und allergischem Asthma sind. Durch ihre Produktion von Typ 2 Zytokinen stoßen sie eine Vielzahl von pathophysiologischen Interaktionen an. Es war möglich bei Probanden mit vorangegangener Immuntherapie, SCIT bzw. SLIT, den negativen Effekt auf die Anzahl der ILC2s und PGE2 nachzuweisen. Der klinische Stellenwert einer Immuntherapie in der Behandlung allergischer Erkrankung wurde durch unsere Arbeit unterstrichen.

## 7. Anhang

### 7.1. Übersicht klinischer Daten der OFF-Season

Übersicht Klinischer Daten OFF-Season (Mean +/- SEM)

	Kontroll en	Allergische Rhinitis ohne SCIT	Allergische Rhinitis mit SCIT	Allergisches Asthma ohne SCIT	Allergisches Asthma mit SCIT
<b>mRQLQ Gesamtergebnis</b>	0.76 ± 0.33	0.61± 0.23	0.5 ± 0.23	1.3 ± 0.56	0.48 ±
<b>mRQLQ Ergebnis Aktivitätseinschränkung</b>	0.076 ± 0.044	0.5 ± 0.2	0.17 ± 0.17	0.72 ± 0.42	0.19 ± 0.1
<b>mRQLQ Ergebnis Praktische Probleme</b>	0.41 ± 0.18	0.5 ± 0.33	0.69 ± 0.37	1.8 ± 0.84	0.43 ± 0.28
<b>mRQLQ Ergebnis Nasale Symptome</b>	0.61± 0.21	0.79 ± 0.37	0.75 ± 0.31	2.3 ± 0.97	0.81 ± 0.38
<b>mRQLQ Ergebnis Augensymptome</b>	0.21± 0.17	0.25 ± 0.18	0.33 ± 0.19	0.89 ± 0.51	0.14 ± 0.1
<b>mRQLQ Ergebnis andere Symptome</b>	0.65 ± 0.26	0.58 ± 0.33	0.63 ± 0.38	1.1 ± 0.39	0.81 ± 0.38
<b>FEV1 (L)</b>	3.7 ± 0.2	4.1 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2
<b>FVC (L)</b>	4.4 ± 0.2	4.9 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2
<b>MEF25 (L)</b>	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.3	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.3
<b>Gesamtzellzahl (x10<sup>4</sup>/mL)</b>	112 ± 13	108 ± 13	100 ± 26	110 ± 31	84 ± 13

## 7.2. Sputum Zelldifferenzierung der OFF-Season

Sputum Zelldifferenzierung OFF-Season (Mittelwert +/- Standardfehler)

	Kontrollen	Allergische Rhinitis ohne SCIT	Allergische Rhinitis mit SCIT	Allergisches Asthma ohne SCIT	Allergisches Asthma mit SCIT
<b>Macrophagen [%]</b>	80 ± 4.1	79 ± 8.6	84 ± 2.4	77 ± 8.0	80 ± 6.7
<b>Neutrophile [%]</b>	21 ± 4	17 ± 6.1	14 ± 2.2	16 ± 7.6	16 ± 4.7
<b>Eosinophile [%]</b>	0.39 ± 0.1	2.8 ± 1.4	1 ± 0.45	6 ± 2.1	2.9 ± 2.5
<b>Lymphozyten [%]</b>	0.42 ± 0.21	0.67 ± 0.21	1.4 ± 0.77	1.6 ± 0.76	0.63 ± 0.26

### 7.3. Mini Rhinitis Quality of Life Questionnaire (deutsche Version)

PSQ20 W4<sup>1</sup>

Patientennummer:

Datum:

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

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

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

PSQ20 W4<sup>1</sup>

Patientennummer:

Datum:

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

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

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

## **8. Publikationen in Peer Review Journals und Kongressbeiträge**

Wang SH, Zissler UM, Buettner M, Heine S, Heldner A, Kotz S, Pechtold L, Kau J, Plaschke M, Ullmann JT, Guerth F, Oelsner M, Alessandrini F, Blank S, Chaker AM, Schmidt-Weber CB, Jakwerth CA. **An exhausted phenotype of TH 2 cells is primed by allergen exposure, but not reinforced by allergen-specific immunotherapy.** *Allergy*. 2021 Sep;76(9):2827-2839. doi: 10.1111/all.14896. Epub 2021 May 26. PMID: 33969495.

Jakwerth CA, Chaker AM, Guerth F, Oelsner M, Pechtold L, Zur Bensen LS, Ullmann JT, Krauss-Etschmann S, Erb A, Kau J, Plaschke M, Winkler M, Kurz A, Kloss A, Esser-von Bieren J, Schmidt-Weber CB, Zissler UM. **Sputum microRNA-screening reveals Prostaglandin EP3 receptor as selective target in allergen-specific immunotherapy.** *Clin Exp Allergy*. 2021 Dec;51(12):1577-1591. doi: 10.1111/cea.14013. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34514658.

Musiol S, Alessandrini F, Jakwerth CA, Chaker AM, Schneider E, Guerth F, Schnautz B, Grosch J, Ghiordanescu I, Ullmann JT, Kau J, Plaschke M, Haak S, Buch T, Schmidt-Weber CB, Zissler UM. **TGF- $\beta$ 1 Drives Inflammatory Th Cell But Not Treg Cell Compartment Upon Allergen Exposure.** *Front Immunol*. 2022 Jan 7;12:763243. doi: 10.3389/fimmu.2021.763243. PMID: 35069535; PMCID: PMC8777012.

Abstract EAACI Congress Lisbon 2019

**Influence of the lower airways Innate Lymphoid cells-2 (ILC2) in grass-pollen allergic rhinitis and asthma patients** Ulrich M, Zissler, Constanze A, Jakwerth, Josephine Kau, Mirjam Plaschke, Carsten B. Schmidt-Weber, Adam M. Chaker

## **9. Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber, für die freundliche Überlassung des Themas. Des weiteren danke ich Herrn Dr. Zissler und Herrn P.D. Dr. Chaker für die gute Betreuung dieser Arbeit sowie die Hilfe und Unterstützung über die letzten Jahre. Ich danke auch meiner Mitdoktorantin Frau Plaschke für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung dieser Arbeit sowie meines Studiums. Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die in der Studie mitgemacht haben.

## **10. Literaturverzeichnis**

- ABRAMSON, M. J., PUY, R. M. & WEINER, J. M. 2010. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd001186.
- AGGARWAL, S., MOODLEY, Y. P., THOMPSON, P. J. & MISSO, N. L. 2010. Prostaglandin E2 and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*, 40, 85-93.
- AKDIS, C. A. & AKDIS, M. 2015. Advances in allergen immunotherapy: aiming for complete tolerance to allergens. *Sci Transl Med*, 7, 280ps6.
- ARON, J. L. & AKBARI, O. 2017. Regulatory T cells and type 2 innate lymphoid cell-dependent asthma. *Allergy*, 72, 1148-1155.
- BACHERT, C., LANGE, B. & VIRCHOW, J. C. 2005. Asthma und allergische Rhinitis: eine Erkrankung mit zwei Gesichtern, Georg Thieme Verlag.
- BAL, S. M., BERNINK, J. H., NAGASAWA, M., GROOT, J., SHIKHAGAIE, M. M., GOLEBSKI, K., VAN DRUNEN, C. M., LUTTER, R., JONKERS, R. E., HOMBRINK, P., BRUCHARD, M., VILLAUDY, J., MUNNEKE, J. M., FOKKENS, W., ERJEFALT, J. S., SPITS, H. & ROS, X. R. 2016. IL-1beta, IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol*, 17, 636-45.
- BIERMANN, J., MERK, H. F., WEHRMANN, W., KLIMEK, L. & WASEM, J. 2013. Allergische Erkrankungen der Atemwege—Ergebnisse einer umfassenden Patientenkohorte in der deutschen gesetzlichen Krankenversicherung. *Allergo J*, 22, 366-73.
- CAFFARELLI, C., PRIFTIS, K., MASTRORILLI, C. & GARCIA-MARCOS, L. 2018. Editorial: The Parallel March of Asthma and Allergy in Childhood: A Multi-Perspective Approach. *Frontiers in Pediatrics*, 6.
- CHACKERIAN, A. A., OLDHAM, E. R., MURPHY, E. E., SCHMITZ, J., PFLANZ, S. & KASTELEIN, R. A. 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*, 179, 2551-5.
- CHEN, R., SMITH, S. G., SALTER, B., EL-GAMMAL, A., OLIVERIA, J. P., OBMINSKI, C., WATSON, R., O'BYRNE, P. M., GAUVREAU, G. M. & SEHMI, R. 2017. Allergen-induced Increases in Sputum Levels of Group 2 Innate Lymphoid Cells in Subjects with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 196, 700-712.
- CLOUGH, S. 2011. Gender and the hygiene hypothesis. *Social science & medicine*, 72, 486-493.
- COSMI, L., ANNUNZIATO, F., GALLI, M. I. G., MAGGI, R. M. E., NAGATA, K. & ROMAGNANI, S. 2000. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol*, 30, 2972-9.
- COSMI, L., LIOTTA, F., MAGGI, L. & ANNUNZIATO, F. 2017. Role of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17, 66.
- DELLER, T. 2018. *Histologie—Das Lehrbuch*, Elsevier Health Sciences.
- DOHERTY, T. A. & BROIDE, D. H. 2015. Group 2 innate lymphoid cells: new players in human allergic diseases. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 25, 1-11; quiz 2p following 11.
- ENG, P. A., BORER-REINHOLD, M., HEIJNEN, I. A. & GNEHM, H. P. 2006. Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood. *Allergy*, 61, 198-201.
- GOMPF, A., DORN-BEINEKE, A., FREY, O., KLOUCHE, M., SCHEFFOLD, A., BACHER, P., KERN, F., GIEBEL, B., NEBE, C. T. & RENZ, H. 2015. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*, Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- GRAHAM-ROWE, D. 2011. Lifestyle: When allergies go west. *Nature*, 479, S2-S4.

- HAFTENBERGER, M., LAUSSMAN, D., ELLERT, U., KALCKLÖSCH, M., LANGEN, U., SCHLAUD, M., SCHMITZ, R. & THAMM, M. 2013. Prävalenz von Sensibilisierungen gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 56, 687-697.
- HALIM, T. Y., HWANG, Y. Y., SCANLON, S. T., ZAGHOUBANI, H., GARBI, N., FALLON, P. G. & MCKENZIE, A. N. 2016. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat Immunol*, 17, 57-64.
- HEPPT, W., RENZ, H. & RÖCKEN, M. 2013. *Allergologie*, Springer-Verlag.
- HEPPT, W. J. & BACHERT, C. 2010. *Praktische Allergologie*, Georg Thieme Verlag.
- JACOBSEN, L. 2001. Preventive aspects of immunotherapy: prevention for children at risk of developing asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 87, 43-6.
- 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, 8.
- JIA, Y., FANG, X., ZHU, X., BAI, C., ZHU, L., JIN, M., WANG, X., HU, M., TANG, R. & CHEN, Z. 2016. IL-13(+) Type 2 Innate Lymphoid Cells Correlate with Asthma Control Status and Treatment Response. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 55, 675-683.
- KATO, A. 2019. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Diseases. *Chest*, 156, 141-149.
- KIM, J., CHANG, Y., BAE, B., SOHN, K. H., CHO, S. H., CHUNG, D. H., KANG, H. R. & KIM, H. Y. 2019. Innate immune crosstalk in asthmatic airways: Innate lymphoid cells coordinate polarization of lung macrophages. *J Allergy Clin Immunol*, 143, 1769-1782.e11.
- KOCH, S., SOPEL, N. & FINOTTO, S. 2017. Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Seminars in Immunopathology*, 39, 55-68.
- LANGEN, U., SCHMITZ, R. & STEPPUHN, H. 2013. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- LAO-ARAYA, M., STEVELING, E., SCADDING, G. W., DURHAM, S. R. & SHAMJI, M. H. 2014. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 134, 1193-5.e4.
- LECH, Z., CHALUBINSKI, M., KOSIŃSKI, S., SMORAWSKA, E., BASSIN, C., AKDIS, C. A., GRZEGORCZYK, J. & KOWALSKI, M. L. 2016. Prostaglandin E2 and lipoxin A4 in PBMCs are associated with immune tolerance during venom immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 1199-1202.e2.
- LICARI, A., CAIMMI, S., BOSA, L., MARSEGLIA, A., MARSEGLIA, G. L. & CAIMMI, D. 2014. Rhinosinusitis and Asthma: A Very Long Engagement. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27, 499-508.
- LINNEMANN, M. & KÜHL, M. 2006. Biochemie für Mediziner: ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug, Springer-Verlag.
- LOMBARDI, V., BEURAUD, C., NEUKIRCH, C., MOUSSU, H., MORIZUR, L., HORIOT, S., LUCE, S., WAMBRE, E., LINSLEY, P., CHOLLET-MARTIN, S., BARON-BODO, V., AUBIER, M. & MOINGEON, P. 2016. Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 305-308.
- MAGGI, L., MONTAINI, G., MAZZONI, A., ROSSETTINI, B., CAPONE, M., ROSSI, M. C., SANTARLASCI, V., LIOTTA, F., ROSSI, O., GALLO, O., DE PALMA, R., MAGGI, E., COSMI, L., ROMAGNANI, S. & ANNUNZIATO, F. 2017. Human circulating group 2 innate lymphoid cells can express CD154 and promote IgE production. *J Allergy Clin Immunol*, 139, 964-976.e4.
- MARIC, J., RAVINDRAN, A., MAZZURANA, L., BJÖRKLUND, Å. K., VAN ACKER, A., RAO, A., FRIBERG, D., DAHLÉN, S.-E., HEINEMANN, A., KONYA, V. & MJÖSBERG, J. 2018. Prostaglandin

- E2 suppresses human group 2 innate lymphoid cell function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141, 1761-1773.e6.
- MAZZURANA, L., RAO, A., VAN ACKER, A. & MJOSBERG, J. 2018. The roles for innate lymphoid cells in the human immune system. *Semin Immunopathol*, 40, 407-419.
- MJÖSBERG, J. & EIDSMO, L. 2014. Update on innate lymphoid cells in atopic and non-atopic inflammation in the airways and skin. *Clin Exp Allergy*, 44, 1033-43.
- MJOSBERG, J. & SPITS, H. 2016. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1265-1276.
- MOLDAVER, D. M., LARCHÉ, M. & RUDULIER, C. D. 2017. An Update on Lymphocyte Subtypes in Asthma and Airway Disease. *Chest*, 151, 1122-1130.
- MOOTE, W., KIM, H. & ELLIS, A. K. 2018. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14, 53.
- NEURATH, M. F. & FINOTTO, S. 2016. IL-9 signaling as key driver of chronic inflammation in mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 29, 93-9.
- POKIESER, L., BERNHARDT, K., KREUZER, A. & SCHALLESCHAK, J. 2011. *Klinische Zytologie der Lunge und Pleura: Handbuch und Farbatlas*, Springer-Verlag.
- REN, J., KARPINSKI, E. & BENISHIN, C. G. 1995. Prostaglandin E2 contracts vascular smooth muscle and inhibits potassium currents in vascular smooth muscle cells of rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 710-9.
- RING, J., BACHERT, C., BAUER, C.-P. & CZECH, W. 2010. *Weißbuch Allergie in Deutschland*, Springer Medizin.
- SALTER, B. M., AW, M. & SEHMI, R. 2019. The role of type 2 innate lymphoid cells in eosinophilic asthma. *J Leukoc Biol*, 106, 889-901.
- SASTRE, B. & DEL POZO, V. 2012. Role of PGE2 in asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *Mediators Inflamm*, 2012, 645383.
- SCHMITZ, R., KUHNERT, R. & THAMM, M. 2017. 12-Monats-Prävalenz von Allergien in Deutschland. Robert Koch-Institut.
- SCOVILLE, S. D., FREUD, A. G. & CALIGIURI, M. A. 2019. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*, 56, 100-106.
- SHAMJI, M. H. & DURHAM, S. R. 2017. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140, 1485-1498.
- SMITH, S. G., CHEN, R., KJARSGAARD, M., HUANG, C., OLIVERIA, J. P., O'BYRNE, P. M., GAUVREAU, G. M., BOULET, L. P., LEMIERE, C., MARTIN, J., NAIR, P. & SEHMI, R. 2016. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*, 137, 75-86.e8.
- TRABANELLI, S., GOMEZ-CADENA, A., SALOME, B., MICHAUD, K., MAVILIO, D., LANDIS, B. N., JANDUS, P. & JANDUS, C. 2018. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. *Cytometry B Clin Cytom*, 94, 392-399.
- TURNER, J. E., MORRISON, P. J., WILHELM, C., WILSON, M., AHLFORS, H., RENAULD, J. C., PANZER, U., HELMBY, H. & STOCKINGER, B. 2013. IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J Exp Med*, 210, 2951-65.
- VAN DER VALK, J. P., DE JONG, N. W. & GERTH VAN WIJK, R. 2015. Review on immunotherapy in airway allergen sensitised patients. *Neth J Med*, 73, 263-9.
- VON HOESSLIN, H. 2013. *Das sputum*, Springer-Verlag.
- WECHSLER, M. E., FULKERSON, P. C., BOCHNER, B. S., GAUVREAU, G. M., GLEICH, G. J., HENKEL, T., KOLBECK, R., MATHUR, S. K., ORTEGA, H., PATEL, J., PRUSSIN, C., RENZI, P., ROTHENBERG, M. E., ROUFOSSE, F., SIMON, D., SIMON, H. U., WARDLAW, A., WELLER, P. F. &

- KLION, A. D. 2012. Novel targeted therapies for eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 130, 563-71.
- YU, Q. N., GUO, Y. B., LI, X., LI, C. L., TAN, W. P., FAN, X. L., QIN, Z. L., CHEN, D., WEN, W. P., ZHENG, S. G. & FU, Q. L. 2018. ILC2 frequency and activity are inhibited by glucocorticoid treatment via STAT pathway in patients with asthma. *Allergy*, 73, 1860-1870.
- ZHOU, Y., WANG, W., ZHAO, C., WANG, Y., WU, H., SUN, X., GUAN, Y. & ZHANG, Y. 2018. Prostaglandin E(2) Inhibits Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Allergic Airway Inflammation Through E-Prostanoid 4-Cyclic Adenosine Monophosphate Signaling. *Front Immunol*, 9, 501.
- ZHU, J. 2017. GATA3 Regulates the Development and Functions of Innate Lymphoid Cell Subsets at Multiple Stages. *Front Immunol*, 8, 1571.
- ZISSLE, U. 2012. Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum.
- ZISSLER, U. M., ESSER-VON BIEREN, J., JAKWERTH, C. A., CHAKER, A. M. & SCHMIDT-WEBER, C. B. 2016. Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy*, 71, 475-494.

