

Die Rolle von Th9 und regulatorischen T-Zellen in allergischer Rhinitis und Asthma und deren Bedeutung in der allergenspezifischen Immuntherapie

Mirjam Plaschke

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

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 20.06.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 06.02.2024
angenommen.

Abstract

Die Differenzierung von CD4 positive T-Helferzellen in verschiedene Subsets wie Th2, Th9 und regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine entscheidende Rolle bei allergischen Erkrankungen als pro- bzw. antiinflammatorische Faktoren. Während die proinflammatorische Rolle von Th2-Zellen bei allergischer Rhinitis und allergischem Asthma schon lange bekannt ist, gibt es besonders bezüglich Th9- und Treg-Zellen noch viele offene Fragen. In dieser Arbeit wurden diese Zellen lokal mithilfe von induziertem Sputum und peripher anhand von Blutproben von saisonalen allergischen Rhinitikern und Asthmatikern mit und ohne erfolgter allergenspezifischer Immuntherapie (AIT) quantifiziert. Allergenexposition führte zu einer Induktion von Th2- und Th9-Zellen sowie zu einer Reduktion von Treg-Zellen, während sich bei erfolgter AIT eine Suppression von Th2- und Th9-Zellen zeigte. Um diese Ergebnisse zu unterstreichen, wurden die Zytokinlevel in induziertem Sputum gemessen, die entsprechend ihrer assoziierten Zellen stärker oder geringer exprimiert wurden. So zeigte sich ein Abfall von IL9 und TGF β bei Patienten mit erfolgter AIT bei gleichzeitig erhöhten Th9 und verringerten Treg-Spiegeln. Aus der Zusammenschau der Ergebnisse kann man schließen, dass TGF β und IL9 sich konkordant zu Th9-Zellen proinflammatorisch verhalten, während Treg-Zellen TGF β -unabhängig immunmodulatorisch wirken.

The differentiation of CD4 positive T-helper cells into various subsets such as Th2, Th9 and Tregs plays an important role in the development of allergic diseases. While Th2 cells are known to play a proinflammatory role in allergic rhinitis and asthma, there are still many questions unanswered regarding Th9 and Treg cells. Here Th9 and Treg cells were quantified both locally in induced sputum and systemically in blood of allergic rhinitis and asthma patients with or without allergen-specific immunotherapy (AIT). Allergen exposure induced local and systemic Th2, Th9 cell and reduced Tregs, while therapeutic allergen exposure by AIT suppressed Th2 and Th9 cell frequencies. To underline these findings cytokine levels in induced sputum were measured, which showed to be corresponding to their associated cells. Therefore IL-9 and TGF β -levels in patients who underwent AIT were decreased along induced Th9 levels and decreased Treg cells. Altogether, these findings support that TGF β and IL9 in allergic airway inflammation act concordantly to Th9-cells, while Treg cells seem to be immunomodulatory and TGF β -independent.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Allergische Rhinitis und allergisches Asthma	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Definition und Pathophysiologie	2
1.1.3 Klinisches Bild – One airway, one disease	3
1.2 Molekulare Vorgänge bei allergischer Rhinitis und Asthma	5
1.2.1 Th2-Zellen und das Th1/Th2 Modell	5
1.2.2 Rolle von Th9 in Allergie und Asthma	6
1.2.3 Zusammenhang zwischen Th9- und Th2-Zellen	9
1.2.4 Differenzierung der Th9-Zellen	10
1.2.5 Rolle von regulatorischen T-Zellen in Allergie und Asthma	12
1.3 Allergenspezifische Immuntherapie (AIT)	15
1.4 Sputum	18
1.5 Zielsetzung	20
2. Material und Methodik	21
2.1 Materiallisten	21
2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
2.1.2 Reagenzien und Antikörper-Panel	24
2.1.3 Programme	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Probanden	27
2.2.1.1 Ethische Richtlinien	27
2.2.1.2 Probandengruppen	27
2.2.1.3 Probandencharakterisierung	29

2.2.1.4	Ausschlusskriterien	30
2.2.2	Probengewinnung	30
2.2.2.1	Venöse Blutentnahme	30
2.2.2.2	Sputuminduktion und -gewinnung	30
2.2.3	Sputumaufbearbeitung	32
2.2.4	PBMC Isolierung	34
2.2.5	Erstellung des Panels	35
2.2.6	Oberflächen- und intrazelluläres Staining	36
2.2.7	Durchflusszytometrie	37
2.2.7.1	Kompensation und Kontrollen	38
2.2.7.2	Gating Strategien	40
2.2.7.2.1	Th9-Gating und Th2-Gating	40
2.2.7.2.2	Treg Gating	42
2.2.8	Zytospins	43
2.2.8.1	Anfärbung	43
2.2.8.2	Auszählung	44
2.2.9	Proteinanalysen aus Sputum-Supernatants	44
2.2.10	Statistische Tests zur Auswertung	47
3.	Auswertung und Ergebnisse	48
3.1	Demographische Daten	48
3.1.1	Altersverteilung und Geschlechterverteilung	48
3.1.2	BMI	49
3.1.3	Sputumqualität	50
3.2	Klinische Daten	52
3.2.1	Lungenfunktion	53
3.2.2	mRQLQ und IgE	54
3.2.3	GINA-Score	55
3.3	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	56
3.3.1	Th2-Zellen im Durchflusszytometer	56
3.3.1.1	Sputum	56
3.3.1.2	PBMC	57
3.3.2	Th9-Zellen im Durchflusszytometer	59

3.3.2.1 Sputum	59
3.3.2.2 PBMC	60
3.3.3 Treg Zellen im Durchflusszytometer	62
3.3.3.1 Sputum	62
3.3.3.2 PBMC	64
3.4 Korrelationen der durchflusszytometrischen und klinischen Daten	65
3.4.1 Korrelation IgE und Th2	65
3.4.2 Korrelation IgE und Th9	66
3.4.3 Korrelation RQLQ und Th2	66
3.4.4 Korrelation RQLQ und Th9	67
3.4.5 Korrelation RQLQ-Scores und Th2, Th9 und Treg Zellen	68
3.4.6 Korrelation Th2 mit Th9	68
3.5 Ergebnisse der Proteinanalysen	70
3.5.1 Th2 assoziierte Zytokine	70
3.5.2 Th9 assoziierte Zytokine	72
3.5.3 Th1 und Treg assoziierte Zytokine	76
3.6 Ergebnisse der Zytospins	79
4. Diskussion	81
4.1 Studiendesign	81
4.1.1 Größe der Probandengruppen	81
4.1.2 Charakteristika der Probandengruppen	81
4.1.3 Unterschiede in der Immuntherapie	82
4.1.4 Probenentnahme	83
4.1.5 Sputumqualität	84
4.1.6 Gating Strategie	85
4.2 Klinische Daten	87
4.2.1 Lungenfunktion	87
4.2.2 Rhinoconjunctivitis Quality of Life mini Questionnaire (mRQLQ)	87
4.2.3 GINA-Score	88
4.3 Durchflusszytometrische Analyse und Zytokine in Sputum-überständen	89

4.3.1 Einfluss von Immuntherapie auf Th2-, Th9- und regulatorische T-Zellen	90
4.3.2 Periphere Immunantwort und lokale Atemwegsentszündung	91
4.3.3 Zytokine – Modulatoren der allergischen Immunantwort	92
4.3.3.1 IL-5 und Eosinophile	93
4.3.3.2 IL-9 und TGF β – proinflammatorische Zytokine	94
4.3.3.3 Regulatorische T-Zellen als Immunmodulatoren	96
4.3.3.4 IL-6 und Makrophagen	97
4.4 Korrelation mit Klinik	100
4.5 Zusammenfassung	101
4.6 Ausblick	102
Literaturverzeichnis	XI
Publikationen	XXXVI
Anhang	XXXVII
Danksagung	XLV

Abkürzungsverzeichnis

AA	Gruppe der allergischen Asthmatiker
AIT	allergenspezifische Immuntherapie
ANOVA	analysis of variance
APC	Antigen präsentierende Zelle
AR	Gruppe der allergischen Rhinitiker
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMI	Body-mass-Index
CCL-11	CC-chemokine ligand 11
CD4	cluster of differentiation 4
CPT	Cell Preparation Tube
DTT	Dithiothreitol
E1	Epithelzelle 1
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPIT	epikutane Immuntherapie
FACS	Fluorescent activated cell sorter
Fc	fragment crystallisable
FEV1	Einsekundenkapazität
FMO	Fluorescence Minus One
FoxP3	forkhead box P3
FVC	Vitalkapazität
FVS	Fixable Viability Stain
GINA	Global Initiative for Asthma
ICD 10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IDIT	intrakutane Immuntherapie
IFNγ	Interferon gamma
IgE	Immunglobulin E
IL-	Interleukin-
IL- R	Interleukin-Rezeptor
ILC2	Innate Lymphoid Cells Type 2

ILIT	intralymphatische Immuntherapie
IRF	Interferon regulatory factor
LNIT	lokal nasale Immuntherapie
MEF 25	Maximal expiratory flow
MEF25 %	Expiratorischer Fluss bei 25% der forcierten Vitalkapazität
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
mRQLQ	mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire
n	Anzahl
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RQLQ	Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire
SCIT	subkutane Immuntherapie
SLIT	sublinguale Immuntherapie
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TGFβRII	Transforming Growth Factor beta Rezeptor II
Th	T-Helferzelle
Th1	T-Helferzelle Subtyp 1
Th17	T-Helferzelle Subtyp 17
Th2	T-Helferzelle Subtyp 2
Th9	T-Helferzelle Subtyp 9
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
v:v	volume per volume
μg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf einer allergischen Reaktion	2
Abbildung 2: Übersicht der Einflüsse der Th9-Zellen	7
Abbildung 3: Übersicht der verschiedenen T-Zell-Subtypen	10
Abbildung 4: Probandengruppen	28
Abbildung 5: Protokoll der Probengewinnung	31
Abbildung 6: Protokoll der Sputumprozessierung	34
Abbildung 7: Kontrollfärbung für Th2- und Th9-Zellen für PBMC (A) und Sputum (B)	38
Abbildung 8: Kontrollfärbung für regulatorische T-Zellen für PBMC (A) und Sputum (B)	39
Abbildung 9: Gating für Th2- und Th9-Zellen für PBMC	40
Abbildung 10: Gating für Th2- und Th9-Zellen für Sputum	41
Abbildung 11: Gating für regulatorische T-Zellen für PBMC	42
Abbildung 12: Gating für regulatorische T-Zellen für Sputum	43
Abbildung 13: Immunoassay nach dem LegendPlex Kit	46
Abbildung 14: Geschlechterverteilung	49
Abbildung 15: GINA-Score	55
Abbildung 16: Th2-Zellen im Sputum	57
Abbildung 17: Th2-Zellen in PBMC	58
Abbildung 18: Th9-Zellen im Sputum	60
Abbildung 19: Th9-Zellen in PBMC	61
Abbildung 20: Treg Zellen in Sputum	63
Abbildung 21: Treg Zellen in PBMC	64
Abbildung 22: Korrelation IgE und Th2-Zellen	65
Abbildung 23: Korrelation IgE und Th9-Zellen	66
Abbildung 24: Korrelation Th2-Zellen und RQLQ	67
Abbildung 25: Korrelation Th9-Zellen und RQLQ	67
Abbildung 26: Korrelation Th9- und Th2-Zellen	69
Abbildung 27: Vergleich der Th2 assoziierten Zytokine während der Graspollensaison	70

Abbildung 28: Vergleich der Th2 assoziierten Zytokine außerhalb der Graspollensaison	71
Abbildung 29: Vergleich der Th9 assoziierten Zytokine während der Graspollensaison	72
Abbildung 30: Vergleich der Th2 assoziierten Zytokine außerhalb der Graspollensaison	73
Abbildung 31: IL-6 während der Graspollensaison	74
Abbildung 32: IL-6 außerhalb der Graspollensaison	75
Abbildung 33: Th1 und Treg assoziierte Zytokine während der Graspollensaison	76
Abbildung 34: Th1 und Treg assoziierte Zytokine außerhalb der Graspollensaison	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte	23
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Reagenzien	24
Tabelle 4: Übersicht der Panel	26
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Programme	26
Tabelle 6: Übersicht der analysierten Zytokine	44
Tabelle 7: Demographische Daten	48
Tabelle 8: BMI (Body Mass Index)	49
Tabelle 9: Angaben zur generellen Sputumqualität aller Proben	51
Tabelle 10: Klinische Charakterisierung	52
Tabelle 11: Übersicht der Sputum-Zytokinlevel während der Graspollensaison	78
Tabelle 12: Auszählung der Zytospins während der Graspollen-Saison	79

1. Einleitung

1.1 Allergische Rhinitis und allergisches Asthma

1.1.1 Epidemiologie

Eine laufende oder verstopfte Nase, Niesreiz, verquollene und gerötete Augen, Juckreiz, trockener Husten bis hin zur Atemnot sind allergische Schlüssel-Symptome. Laut Robert Koch Institut (RKI) leiden aktuell fast 20% der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland an einer Allergie. Die Lebenszeitprävalenz für Asthma bronchiale liegt bei 8,6% und bei Heuschnupfen steigt der Anteil sogar auf 14,8%. Nahezu jeder zweite Deutsche weist eine Sensibilisierung gegen mindestens eines von 50 verbreiteten Einzelallergenen auf (Bergmann KC, 2016). Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) zeigen, dass die Prävalenz für Allergien, die in den letzten Jahrzehnten angestiegen war, nun auf hohem Niveau ein Plateau erreicht zu haben scheint. Das gilt allerdings in diesem Fall nur für die allergische Rhinitis. Bei allergischem Asthma bronchiale steigt die Prävalenz immer noch an und die Erkrankung betrifft folglich immer mehr Patienten (Langen, Schmitz, & Steppuhn, 2013; Roma Thamm & Antje Hüther, 2018).

Die allergischen Leitsymptome Niesen, Juckreiz, Verstopfung der Nase und/oder Rhinorrhoe haben Einfluss auf den Schlaf, die Leistungsfähigkeit und auf das soziale Leben der Betroffenen und somit einen großen Einfluss auf deren Lebensqualität (Schatz, 2007; Walker et al., 2007). In der Krankheitskostenstatistik des Statistischen Bundesamtes von 2019 werden die Krankheitskosten von Asthma (ICD-10 „J45, J46“) für das Jahr 2015 mit 1,9 Mrd. Euro angegeben und zeigt somit dessen große volkswirtschaftliche Relevanz auf (Bundesamt, 2019).

1.1.2 Definition und Pathophysiologie

Der Begriff Allergie wird oft sehr unpräzise und generell benutzt, um hypersensitive Reaktionen auf Umweltantigene zu beschreiben. Die Definition von Allergie beschreibt eine Immunglobulin E (IgE) vermittelte Entzündung nach Kontakt mit einem Allergen. Als solche werden körperfremde, nicht mikrobielle Proteine aus Pollen, Hausstaub, Milben, Tierhaaren, Nahrungsmitteln oder Medikamenten bezeichnet. Warum manche dieser Antigene allergische Reaktionen hervorrufen und andere nicht, ist nicht ausreichend geklärt. Entscheidend ist, dass Allergene gleich wie körpereigene Antigene bei gesunden Probanden, anders als Mikroben, vom Körper toleriert werden und keine Immunantwort generieren (Teale & Klinman, 1980; Van Parijs & Abbas, 1998). Die Exposition der Allergene kann auf verschiedensten Wegen erfolgen. Im Fall der allergischen Rhinitis oder dem allergischen Asthma kommt es aerogen in den Schleimhäuten der oberen und unteren Atemwege zum Kontakt mit dem Allergen.

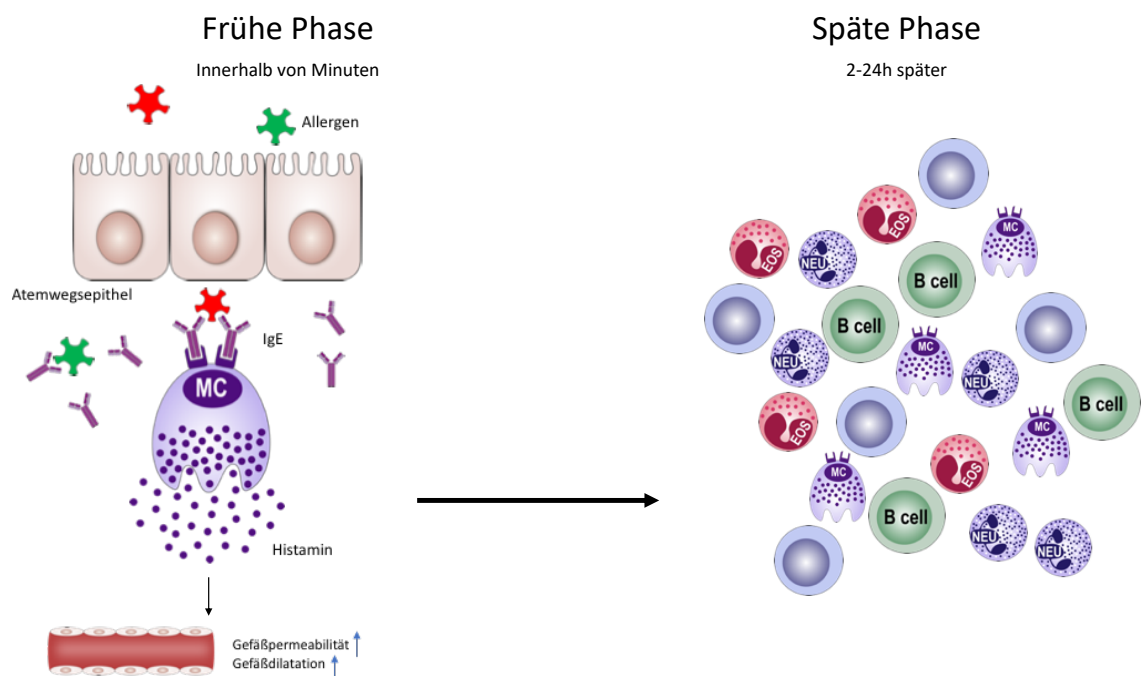


Abbildung 1: Verlauf einer allergischen Reaktion.

In der frühen Phase der Allergie (A), wenige Minuten nach Kontakt zum Allergen in den Atemwegen über das Atemwegsepithel wird das Allergen an vorherrschende IgE gebunden. Diese aktivieren Mastzellen, die wiederum proinflammatorische Mediatoren

wie Histamin freisetzen. Histamin steigert die Gefäßpermeabilität und führt zu einer Gefäßdilatation, das zum klinischen Bild einer Allergie führt. Nach 2 – 24 Stunden kommt es zu einer zweiten Reaktion, der späten-Phase-Reaktion (B). Dabei akkumulieren Eosinophile, Neutrophile und T- und B-Zellen und bilden ein entzündliches Infiltrat und rufen eine langsame Entzündungsreaktion hervor.

IgE bindet an Mastzellen und Basophile und aktiviert diese durch cross-linking (Bischoff, 2007). Auch antigenpräsentierende Zellen wie B-Zellen und dendritische Zellen binden an IgE und führen zu einer T-Zell-Aktivierung und der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, die wiederum Eosinophile aktivieren (Eckl-Dorna et al., 2019). Eosinophile und Mastzellen sezernieren proinflammatorische Mediatoren wie Histamin, Leukotriene, Zytokine und Chemokine, die die Symptome und das klinische Bild von Asthma verstärken (Holgate, 2012). Es kommt zu Gefäßdilatation, erhöhter Gefäßpermeabilität und Reaktion in der glatten Muskulatur. Auf diese unmittelbare Reaktion der Zellen auf das Allergen bei einem bereits sensibilisierten Patienten erfolgt die späte-Phase Reaktion nach zwei bis 24 Stunden (siehe Abb. 1). Hierbei kommt es zur Akkumulation von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen, die eine langsame Entzündungsreaktion hervorrufen. Treten diese Reaktionen wiederholt auf, können die immer wieder ansteigenden IgE- und Mastzellspiegel zu einer chronischen allergischen Erkrankung führen, die wiederum Gewebeschäden und Remodelling des betroffenen Gewebes zur Folge haben (Abul K. Abbas, 2018).

1.1.3 Klinisches Bild – One airway, one disease

Mehrere epidemiologische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Rhinitis und Asthma nachweisen (Bousquet, Vignola, & Demoly, 2003; Linneberg et al., 2002). So zeigen bis zu 80% der Patienten mit allergischem Asthma bronchiale auch Symptome der allergischen Rhinitis (Leynaert et al., 2004). Das klinische Bild von Asthma ist typischerweise durch bronchiale Hyperreagibilität, reversible bronchiale Obstruktion, Remodeling der Atemwege und hohe IgE-Serumspiegel geprägt. Diese Vorgänge führen zu einer Verengung der Atemwege und verursachen wiederholt ein Gefühl von Enge im Brustkorb und Atembeschwerden bis hin zu Atemnot. Ursache dafür ist eine Mastzellaktivierung, die durch IgE Cross-Linking zur Freisetzung von

Histamin und anderen bronchokonstriktorisches Proteasen führt (Holgate, 2012). Zusätzlich zeigen sich häufig rhinitische Symptome wie Niesen und nasaler Juckreiz sowie rezidivierende Konjunktividen.

Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass 15% bis 38% der Patienten mit allergischer Rhinitis bereits asthmatische Symptome zeigen (Gergen & Turkeltaub, 1992; Leynaert, Bousquet, Neukirch, Liard, & Neukirch, 1999). Außerdem konnte für Rhinitiker ein höheres Risiko, an allergischem Asthma zu erkranken, aufgezeigt werden (Leynaert et al., 2004). Aufgrund der Ähnlichkeit der beteiligten Entzündungszellen, Mediatoren und Zytokine in den oberen und unteren Atemwegen (Holgate & Polosa, 2006; Kay, 2001) entstand das „one airway, one disease“ Konzept (Vignola & Bousquet, 2001; U. M. Zissler et al., 2018). Auch wenn in Hinblick auf die Th2-Entzündung Unterschiede in den einzelnen Atemwegen zu finden sind (Giovannini-Chami et al., 2018), sieht „Ein Atemweg, eine Krankheit“ allergische Rhinitis und allergisches Asthma nicht als zwei separate Krankheiten, sondern erkennt den weitreichenden Zusammenhang zwischen den beiden, der über einen anatomischen Zusammenhang, hinausgeht und bei Diagnosestellung und Therapie nicht vernachlässigt werden darf (Min, 2010).

1.2 Molekulare Vorgänge bei allergischer Rhinitis und Asthma

Th-Zellen (T-Helferzellen) mit ihrem Oberflächenmolekül CD4 spielen eine entscheidende Rolle in verschiedensten immunologischen Prozessen z.B. durch Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen oder Reifung von B-Zellen zu Plasmazellen. Sie können Entzündungsprozesse generieren oder auch zur Toleranzentwicklung und Suppression von Inflammation beitragen (Cosmi, Maggi, Santarlasci, Liotta, & Annunziato, 2014).

Durch Kontakt mit Antigenen durch Antigen präsentierende Zellen (APCs) können die Th-Zellen in verschiedene Subtypen differenzieren, die jeweils durch verschiedene Zytokine eine spezifische Immunantwort hervorrufen. In Bezug auf allergische Erkrankungen zeigen manche Subtypen typischerweise eine vermehrte Expression, während andere herunterreguliert werden.

1.2.1 Th2-Zellen und das Th1/Th2 Modell

Wenn das Atemwegsepithel und die darunter liegende Mukosa in Kontakt mit Allergenen kommt, werden diese dort von Antigen präsentierenden Zellen (APCs) wie den dendritischen Zellen oder B-Zellen aufgenommen, in Peptide zerlegt und mithilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse II naiven T-Zellen präsentiert. Diese Interaktion von dendritischen Zellen mit den naiven Th1-Zellen in Anwesenheit von Interleukin 4 (IL-4) führt zu einer Differenzierung in Th2-Zellen und Migration in die Mukosa. Th2-Zellen produzieren und setzen die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 frei (Chaplin, 2006). Damit wird eine allergische Entzündung, die zu Typ 2 Entzündungsreaktionen gehört, ausgelöst. IL-4 verstärkt die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und weiteren Th2-Zellen ins betroffene Gewebe, während IL-5 die eosinophilen Granulozyten aktiviert. IL-13 ist für die vermehrte Schleimproduktion und -sekretion in den Epithelzellen verantwortlich (Abul K. Abbas, 2018). IL-4 und IL-13 induzieren die IgE-Synthese, was die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplex auf den T-Zellen und dem MHC II Antigen auf den B-Zellen erfordert (Punnonen et al., 1993; Vercelli, Jabara, Arai, & Geha, 1989). In Abhängigkeit der T-Zell-Reaktion produzieren B-Zellen allergenspezifische IgE-Antikörper. Es kommt

zum sogenannten Klassenwechsel der Immunglobuline (Prussin & Metcalfe, 2006). Das freigesetzte IgE bindet mit hoher Affinität an den Fc-Rezeptor der Mastzellen und aktiviert diese (Abul K. Abbas, 2018).

Lange Zeit diente das Th1/Th2 Modell, das erstmals von Mosmann und Coffman Ende der 80er Jahre beschrieben wurde, als Erklärung vieler Phänomene des adaptiven Immunsystems. Th1 und Th2-Zellen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinfreisetzung verschiedenen Erkrankungen zugeordnet, bei deren Genese ihnen eine entscheidende Rolle zugeteilt wurde. Den Th1-Zellen wurde beispielsweise IL-2, IFN γ (Interferon gamma) und TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) zugeordnet und den Th2-Zellen die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin, & Coffman, 1986). So sah man das Ungleichgewicht von Th1 und Th2 zu Gunsten der Th2- Zellen als eine mögliche Ursache der Pathologie bei allergischen Erkrankungen an (Mosmann & Coffman, 1989).

Diese Theorie wurde im Laufe der Forschung unter anderem mit dem E1/E2 Paradigma ergänzt, das die Th1/Th2 Hypothese auf Th2-geprägte Epithelzellen erweitert (U. Zissler & Chaker, 2016). Man entdeckte zudem neue Subpopulationen der CD4 positiven Th-Zellen. So sind in der Literatur weitere Th-Zellen beschrieben wie die Th17-Zellen, die regulatorischen T-Zellen und die Th9-Zellen, deren Zytokine Einfluss auf die zelluläre Antwort auf Allergene haben (M. H. Kaplan, Hufford, & Olson, 2015; Saravia, Chapman, & Chi, 2019).

1.2.2 Rolle von Th9 in Allergie und Asthma

Auch wenn IL-9 produzierende Zellen als Th9-Zellen erst 2008 von Veldhoen et al. als solche definiert wurden (M. Veldhoen et al., 2008), gab es schon früher Hinweise auf die proinflammatorische Wirkung von IL-9 bei allergischen Erkrankungen. Nicolaides et al. zeigten bereits 1997 einen Zusammenhang zwischen IL-9 und inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale auf (Nicolaides et al.). Es konnte gezeigt werden, dass IL-9 Mastzellen aktiviert (Matsuzawa et al., 2003) und dass auf Mastzellen, T-Zellen, Atemwegsepithelzellen und Monozyten IL-9-Rezeptoren exprimiert werden

(Sugimoto et al., 2018). IL-9 hat einen modulierenden Einfluss auf die B-Zell-Antwort (Takatsuka et al., 2018), hemmt die IFN- γ Expression (Jia et al., 2017) und induziert IL-13 (Gounni et al., 2004) und CCL-11 (Eotaxin) über STAT3 in der glatten Muskulatur der Atemwege (Yamasaki et al., 2010). Für folgende Th9-assoziierte Gene IL-4Ra, STAT6, TGF β RII, PU.1, OX40, IL-9, IL-9R, SMAD3 und IL-33 konnte ebenfalls eine Verbindung mit Asthma aufgezeigt werden (Parulekar, Atik, & Hanania, 2014; Seumois et al., 2014; Simpson et al., 2014).

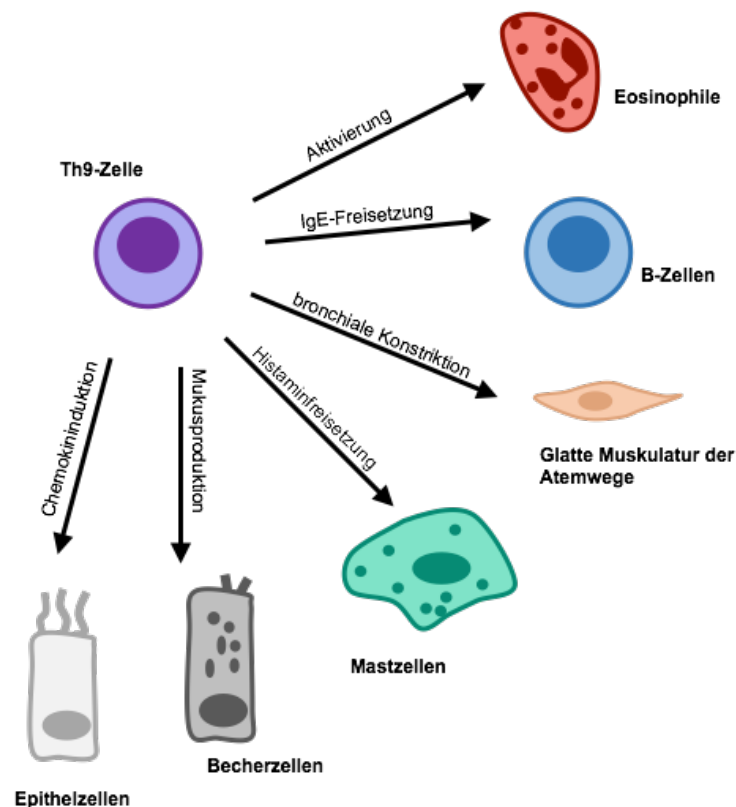


Abbildung 2: Übersicht der Einflüsse der Th9-Zellen.

Schematische Darstellung der verschiedenen Auswirkungen von Th9-Zellen auf das klinische Bild von allergischer Rhinitis und Asthma. Mastzellen werden zur Histaminfreisetzung angeregt, Eosinophile aktiviert und in den Becherzellen wird die Mukussekrektion gesteigert. Th9 spielt eine Rolle in der Regulation von B-Zellen und der IgE-Freisetzung. Des Weiteren kommt es zu einer bronchialen Konstriktion in der glatten Muskulatur der Atemwege und eine Becherzellmetaplasie in den Epithelzellen.

Auch wenn IL-9 von mehreren Zellen wie ILCs (innate Lymphoidzellen), Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Noelle & Nowak, 2010) (Wilhelm et al.,

2011) sezerniert werden kann, konnte gezeigt werden, dass die Th9-Zellen *in vivo* die Hauptquelle von IL-9 sind (Jones, Gregory, Causton, Campbell, & Lloyd, 2012). All diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Th9-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen spielen, siehe Abb. 2.

Während die Rolle von Th2 mit den Th2-assoziierten Schlüssel-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 bei allergischen Erkrankungen schon lange bekannt ist, hat sich erst in den letzten Jahren das Augenmerk der Forschung auf Th9-assoziierte Zytokine wie IL-9, IL-10 und IL-21 erweitert. Eine Vielzahl an Studien zeigte die bedeutende Rolle von IL-9 in allergischen und autoimmunen Krankheiten auf (Stassen, Schmitt, & Bopp, 2012).

Über Th9-Zellen ist bekannt, dass sie hauptsächlich IL-9 sezernieren, aber auch für die Freisetzung von IL-10, IL-17, IL-21 und IL-22 verantwortlich sind (Dardalhon et al., 2008; Jager, Dardalhon, Sobel, Bettelli, & Kuchroo, 2009; M. H. Kaplan et al., 2011).

Erhöhte Spiegel von Th9 und den damit verbundenen Zytokinen konnte in Verbindung mit allergischen Erkrankungen sowohl in Mäusen als auch in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) *in vivo* nachgewiesen werden. Anhand von Mausmodellen konnte *in vitro* und *in vivo* das Mitwirken von Th9 bei allergischen Atemwegserkrankungen aufgezeigt werden. Die Inhalation des Umweltallergens der Hausstaubmilbe führte zu einer frühen *in vivo* Differenzierung von Th9-Zellen bei Mäusen (Jones et al., 2012). Der Transfer von Ovalbuminspezifischen Th2- und Th9-Zellen in Mäuse mit PU.1 (ein Th9 assoziiertes Gen) negativen T-Zellen zeigte eine verringerte Mastzellakkumulation im Gewebe im Vergleich zu den Wildtypmäusen, was auf die Bedeutung von Th9-Zellen bei der Mastzellrekrutierung schließen lässt (Sehra et al., 2015). Anti-IL-9-Antikörper zeigte bei Mäusen eine schützende Wirkung vor Atemwegsremodelling mit einer gleichzeitigen Reduktion der Mastzellen. Atemwegsremodelling, das zu einer verminderten Lungenfunktion führt, konnte durch Aufhebung von IL-9 verhindert werden (Kearley et al., 2011). IL-9-Antikörper konnten außerdem die Anzahl an Th9-Zellen, Th17-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen und Neutrophilen in den Atemwegen bei einem chronisch allergischen Asthmodell in Mäusen reduzieren. Der

Entzündungsindex und der Mukusindex konnte signifikant gesenkt werden (Kim, Cho, Cho, & Woo, 2013).

Auch beim Menschen zeigte der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen IL-9 einen positiven Effekt auf allergische Symptome (Parker et al., 2011). Erhöhte Anteile an CD4-positiven Zellen und höhere IL-9-Spiegel konnten beispielsweise im Serum allergischer Patienten mit Lungenbeteiligung im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen nachgewiesen werden (Kudo, Ishigatsubo, & Aoki, 2013). Bei atopischen Säuglingen konnte durch Hausstaubmilben- oder Katzenallergenstimulation eine vermehrte IL-9 Produktion provoziert werden, während die Spiegel der Zytokine anderer Th-Zellen nicht anstiegen. Bei Asthmatikern und bei Atopikern konnten höhere IL-9-Spiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen festgestellt werden (Erpenbeck et al., 2003; Yao, Tepper, & Kaplan, 2011).

Zur Gänze erklärt ist die Mitwirkung von Th-9 bei allergischen Erkrankungen allerdings noch nicht. Da der Großteil der Studien auf Mausmodellen basiert und einige Ergebnisse sich teilweise widersprechen, sind noch weitere Studien vor allem anhand von humanem Probandenmaterial nötig, um einen vollständigen Überblick zu erlangen (Stassen et al., 2012).

1.2.3 Zusammenhang zwischen Th9- und Th2-Zellen

In der Literatur wurde immer wieder die Frage aufgeworfen, ob es sich bei Th9-Zellen um eine eigene Th-Zellgruppe handelt, die sich aus naiven T-Zellen entwickeln, oder um umprogrammierte Th2-Zellen. Veldhoen et al. beschrieb die Th9-Zelle erstmals und zeigte, dass IL-9 produzierende Zellen sich von den bisher bekannten Subpopulationen der Th-Zellen unterscheiden und diese Th9-Zellen unter Einfluss von TGF β aus Th2-Zellen umprogrammiert werden (M. Veldhoen et al., 2008). Sowohl Th2- als auch Th9- Zellen entstehen im Beisein von IL-4 und zeigen sehr ähnliche Funktionen. Vieles weist darauf hin, dass IL9 und Th2-assoziierte Zytokine zusammenwirken oder sich gegenseitig ergänzen.

Jedoch zeigten weitere Veröffentlichungen, dass sich Th9-Zellen mehr von Th2-Zellen unterscheiden als man ursprünglich dachte. Th9-Zellen exprimieren IL-9, aber setzen keine Schlüsselzytokine anderer Th-Zellen wie

IL-4, IL-5, IL-13 (Th2), IFN γ (Th1) oder IL-17 (Th17) frei. Außerdem ist die Differenzierung von Th9-Zellen vorrangig durch den Transkriptionsfaktor PU.1 reguliert, anders als bei Th2-Zellen, deren Haupttranskriptionsfaktor GATA3 ist (Dardalhon et al., 2008; M. Veldhoen et al., 2008). Mäuse mit PU.1 mangelhaften T-Zellen waren imstande eine normale Th2-Zellantwort zu generieren, aber zeigten eine verminderte allergische Atemwegsentzündung und eine geringere Expression von IL-9 als der Wildtyp (Chang et al., 2010). Munitz und Foster kommen in ihrer Review zum Schluss, dass Th9-Zellen sich in ihrem Signalweg von den anderen Th-Zellen unterscheiden und eine entscheidende Rolle in der Pathologie der allergischen Erkrankungen spielen (2012).

1.2.4 Differenzierung der Th9-Zellen

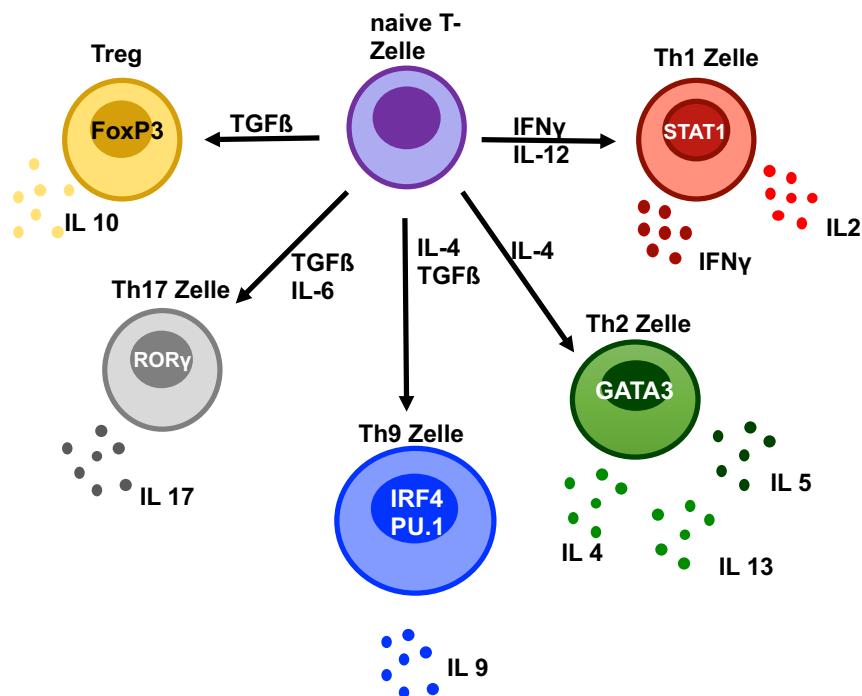


Abbildung 3: Übersicht der verschiedenen T-Zell-Subtypen.

Schematische Darstellung der verschiedenen Subtypen, die sich aus naiven T-Zellen entwickeln können. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Th9-Differenzierung gelegt. Die Interleukine IL2 und IL4 in Zusammenhang mit TGF β sind dabei von entscheidender Bedeutung. Dabei ist die Differenzierung vorrangig durch den Transkriptionsfaktor PU.1 reguliert. IL4 ohne Beisein von TGF β oder IL2 führt zur Differenzierung von Th2-Zellen. Der Haupttranskriptionsfaktor der Th2-

Zelldifferenzierung ist GATA3. TGF β ohne Beisein von IL4 oder IL2 führt nach bisherigen Kenntnissen zur Differenzierung der regulatorischen T-Zellen. Als entscheidender Transkriptionsfaktor muss hier FoxP3 genannt werden.

Bei der Differenzierung von naiven Th-Zellen in die verschiedenen Subtypen zeigen Zytokine wie TGF β oder verschiedene Interleukine die entscheidenden Einflüsse (Dardalhon et al., 2008; Lloyd & Hessel, 2010) (siehe Abb. 3). 1994 stellten Schmitt et al. fest, dass IL-2 essentiell für die IL-9 Produktion ist. In Abhängigkeit von IL-2 und TGF β konnte auch IL-4 eine wichtige Rolle zugemessen werden, da es in dieser Kombination ein starker Antreiber für die IL-9 Produktion zu sein scheint (1994). IL-4 aktiviert zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie STAT6, GATA3 und IRF4, die eine Verbindung mit der Entwicklung von Th9-Zellen aufzeigten (Dardalhon et al., 2008; Staudt et al., 2010; M. Veldhoen et al., 2008). IL-9 produzierende Th9-Zellen erhalten zudem ein autokrines Feedback durch IL-9 (Marc Veldhoen et al., 2008). Auch das TGF β -Signal scheint eine entscheidende Rolle für Th9-Zellen zu spielen. So induziert es bei der Differenzierung von Th9-Zellen die Aktivierung von Smad und die Expression von PU.1, Gene, die den Th9-Zellen zugeordnet werden konnten (Chang et al., 2010; Elyaman et al., 2012). Doch die absolute Notwendigkeit von TGF β 1 für die Entwicklung von Th9-Zellen ist noch nicht endgültig geklärt.

So konnte gezeigt werden, dass Activin A (Teil der TGF β -Superfamilie) anstelle von TGF β 1 Th9-Zellen induzieren kann. Zudem mussten am Mausmodell für allergische Entzündungen sowohl TGF β als auch Activin A ausgeschaltet werden, um eine Senkung von IL-9 in vivo zu erreichen. Es scheint als wäre die Differenzierung von Th9 nicht auf TGF β 1 reduziert, sondern unterläge der größeren TGF β -Superfamilie (Jones et al., 2012). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ein ausgeprägtes Gleichgewicht von Zytokinen für die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th9-Zellen nötig ist, aus denen sich bei anderer Zytokin-Zusammensetzung andere Th-Subsets entwickeln.

So zeigte sich, dass IL-4 alleine ohne Präsenz von TGF β zu einer Th2-Zelldifferenzierung führt (Kopf et al., 1993) und dass das TGF β -Signal ohne Beisein von IL-4 zur Differenzierung in regulatorische T-Zellen führt

(Josefowicz, Lu, & Rudensky, 2012). Die Transkription von Treg-Zellen wird maßgeblich von FoxP3 (forkhead box P3) bestimmt (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003). TGF β ist dabei von Bedeutung, weil es die FoxP3 Genexpression induziert und dadurch die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Treg-Zellen antreibt, die hemmend auf die Th2-Antwort wirken (Chen et al., 2003).

TGF β ist somit entscheidend für Differenzierung verschiedenster Zellen wie von IL17 produzierenden murinen T-Helferzellen (Th17), IL9 produzierenden T-Helferzellen (Th9) und Treg Zellen (Annunziato, Cosmi, Liotta, Maggi, & Romagnani, 2009; Kimura & Kishimoto, 2010; Putheti, 2017). Welches Subset sich durch TGF β bildet, scheint abhängig vom Beisein zusätzlicher Zytokine wie IL6 bei Th17 Zellen oder IL4 bei Th9-Zellen zu sein (Dardalhon et al., 2008; Kimura & Kishimoto, 2010).

Andere Studien weisen jedoch auf eine TGF β -unabhängige Differenzierung von regulatorischen T-Zellen hin und zeigen einmal mehr das Bild von TGF β als pleiotropes Signal auf und unterstreichen dessen Rolle sowohl als proinflammatorischer als auch antiinflammatorischer Faktor (Śledzińska et al., 2013). Die Daten dieser Arbeit in Zusammenhang mit Ergebnissen aus murinen Untersuchungen konnten die These der TGF β -Unabhängigkeit von Treg-Zellen unterstreichen und wurden in einer gemeinsamen Arbeit im Journal *Frontiers in Immunology* veröffentlicht (Musiol et al., 2021). Somit bleibt hinsichtlich der Differenzierung der regulatorischen T-Zellen die Frage offen, welcher Faktor da die entscheidende Rolle spielt.

1.2.5 Rolle von regulatorischen T-Zellen in Allergie und Asthma

Während Th2- und Th9-Zellen bei der Entstehung von allergischen Reaktionen eine verstärkende Rolle spielen, scheinen regulatorische T-Zellen (Tregs) dem Ganzen eher entgegenzuwirken. Sie spielen eine unabdingbare Rolle bei der Modulation von Immunantworten auf körpereigene Antigene und der Verhinderung überschießender Immunreaktionen, die für die Wirtszelle schädlich wären (Sakaguchi, Yamaguchi, Nomura, & Ono, 2008).

So zeigte sich bei einer verminderten Anzahl von Tregs eine vermehrte IgE-Produktion und eine verstärkte allergische Entzündung (Lewkowich et al., 2005). Durch einen IL-10 abhängigen Mechanismus können Tregs die allergische Entzündung verringern und die Th2-Zellspiegel senken (Kearley, Barker, Robinson, & Lloyd, 2005). Vor allem beim gesunden Patienten zeigte sich, dass Tregs durch die Sekretion von IL-10 die Th2-Antworten nach unten regulieren konnten (Hawrylowicz & O'Garra, 2005). Tregs hemmen die allergische Entzündung auch durch direkten Effekt auf Mastzellen, Basophile und Eosinophile und spielen eine entscheidende Rolle im Remodeling von Gewebe (Gri et al., 2008). Außerdem konnte ein direkter Effekt auf B-Zellen nachgewiesen werden mit der Folge, dass die Produktion von allergenspezifischem IgE gehemmt und die Produktion von IgG4 gesteigert wird (Meiler, Klunker, Zimmermann, Akdis, & Akdis, 2008).

In der entzündungshemmenden Wirkung von Tregs scheint das Zytokin IL-27 eine entscheidende Rolle zu spielen. Tregs werden durch IL-27 dazu stimuliert mit Hilfe von Th1-zellvermittelter Immunität Entzündungen einzudämmen (Hall et al., 2012). Eine Studie aus 2019 legt nahe, dass Tregs die Hauptzielzellen von IL-27 in vivo sind, da die antiinflammatorische Wirkung von IL-27 durch die Abwesenheit von Tregs aufgehoben war, während ein Treg-Transfer die Entzündungshemmung wieder ermöglichte. Dies zeigt die bedeutende Rolle von Tregs und IL-27 bei der Immunmodulation (Nguyen et al., 2019).

Transfer von regulatorischen T-Zellen in Mausmodellen allergischer und asthmatischer Inflammation zeigten, dass diese essentiell für die Induktion und Erhaltung von Immuntoleranz sind (Cottrez, Hurst, Coffman, & Groux, 2000). Bei Studien an humanem Probandenmaterial konnte bei gesunden Probanden die Existenz spezifischer regulatorischer T-Zellen gegen häufige Umweltantigene aufgezeigt werden (Akdis et al., 2004). Mehrere klinische Studien an allergischen Probanden zeigten, dass bei der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) die Funktion von Tregs induziert wird und dies den Verlauf der allergischen Erkrankung beeinflussen kann (K. T. Nouri-Aria et al., 2004; Radulovic, Jacobson, Durham, & Nouri-Aria, 2008).

Es zeigt sich also sowohl beim Gesunden als auch bei allergischen Patienten nach allergenspezifischer Immuntherapie die bedeutende Rolle von Tregs bei der Immunmodulation.

Dennoch bleiben viele Fragen bezüglich der Rolle und den genauen zellulären Vorgängen von regulatorischen T-Zellen bei allergischen Erkrankungen offen. In der folgenden Arbeit wird genauer auf die Rolle von Tregs bei der allergischen Immunantwort und bei der allergenspezifischen Immuntherapie eingegangen.

1.3 Allergenspezifische Immuntherapie (AIT)

Der 1911 erstmals von John Freeman und Leonard Noon beschriebene Versuch einer Desensibilisation von Allergien durch Injektionen steigender Dosis eines Allergens stellt bis heute in etablierter Form den einzigen kausalen Therapieansatz von Allergien neben der Vermeidung der Allergenexposition dar (Jackson, 2003; Marek Jutel, Kosowska, & Smolinska, 2016). Das Grundkonzept der Therapie besteht darin, dem Patienten das Allergieauslösende Allergen in steigender Dosis zu verabreichen, bis eine hypersensibilisierte Reaktion auf das Allergen stark geschwächt wird oder gänzlich ausbleibt.

Ziel ist eine Immuntoleranz mittels langfristiger Verschiebung der Immunantwort durch Eingreifen in grundlegende immunologische Mechanismen. Die Induktion einer peripheren T-Zell-Toleranz und die vermehrte Bildung regulatorischer T-Zellen ist ein Schlüsselmechanismus des Therapiekonzepts. Die dabei überwiegende Th2-Antwort soll mit einer vermehrten Th1-Antwort ersetzt werden (Fujita, Soyka, Akdis, & Akdis, 2012). Sowohl die frühe- als auch die späte-Phase-Reaktion sollen durch verminderte Mastzellaktivität und Induktion regulatorischer T- und B-Zellen gehemmt werden. Des Weiteren beinhaltet die Entwicklung von Allergen-Toleranz antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, TGF β und Suppressormechanismen bezüglich des Histaminrezeptors (O. Palomares, Akdis, Martin-Fontecha, & Akdis, 2017).

Die vermehrte Freisetzung von regulatorischen T-Zellen steht im Zusammenhang mit dem Switch von allergenspezifischen B-Zellen zu einer vermehrten IgG Produktion (Frew, 2010). Verschiedene Subklassen von IgG, vor allem IgG3 und teils auch IgG2, zeigten in Studien die Fähigkeit, eine IgE-vermittelte Basophilendegranulation zu verhindern (MacGlashan & Hamilton, 2016).

Auch wenn der genaue Mechanismus der Immuntherapie noch nicht entschlüsselt wurde, konnte gezeigt werden, dass ein Shift von einer Th2- auf eine Th1-Antwort stattfindet und die Produktion von regulatorischen T-Zellen

gesteigert wird, was einen dämpfenden Effekt auf die Immunantwort auf Allergene zeigt (Moote, Kim, & Ellis, 2018). Nach erfolgter Immuntherapie konnte eine Reduktion von Histamin und Tryptase in nasalem Sekret nachgewiesen werden, sowie eine Verringerung der Eosinophilenanzahl, Th2-Zellen und deren Zytokine (Furin et al., 1991; Scadding et al., 2015).

Laut aktueller EAACI Leitlinien ist die Indikation für die Durchführung einer spezifischen Immuntherapie gegeben, wenn eine moderate bis schwere allergische Rhinokonjunktivitis vorliegt, die klinisch relevante Allergie durch einen Pricktest oder spezifisches IgE im Serum nachgewiesen werden kann, eine optimal eingestellte Pharmakotherapie nicht ausreichend ist oder diese aufgrund Nebenwirkungen nicht tragbar ist und die Exposition nicht oder nicht ausreichend verhindert werden kann (Pfaar, Angier, Muraro, Halken, & Roberts, 2020).

Zur Durchführung der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) kann das Allergen auf verschiedenen Wegen dem Patienten zugeführt werden: Die ursprünglichen Methoden sehen eine subkutane (SCIT) oder sublinguale (SLIT) Gabe vor. Dabei beträgt die Dauer der Therapie mindestens 3 Jahre (Pfaar et al., 2014). Neuere Studien berichten von alternativen Methoden wie eine direkte intralymphatische Injektion des Antigens (ILIT), epikutane (EPIT) oder intrakutane (IDIT) Gabe oder eine lokal nasale Applikation (LNIT). Die Immuntherapien bei den in dieser Studie eingeschlossenen Probanden sind auf subkutanem oder sublingualem Wege erfolgt. Cochrane Metaanalysen haben gezeigt, dass sich SCIT bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis als effektiv herausgestellt haben (Głobińska et al., 2018). Bei allergischem Asthma wurde gezeigt, dass Immuntherapie zu einer eindeutigen Reduktion der Symptome und des Medikamentenbedarf führen konnte, besonders bei der SCIT. Allerdings muss die Datenlage mit Vorsicht betrachtet werden bezüglich der Studienqualität und Publikationsbias. Auch sind Langzeiteffekte noch nicht ausreichend erforscht (Dhami, Kakourou, et al., 2017). Dasselbe gilt auch für die Erfolge durch Immuntherapie bei allergischer Rhinitis. Hier waren die Ergebnisse noch eindeutiger als beim allergischen Asthma. Allerdings sind auch hier in der Literatur potentielle Publikationsbias berichtet (Dhami, Nurmatov, et al., 2017).

Auch bezüglich des genauen Mechanismus der AIT herrschen in der Forschung noch Unklarheiten. Der Versuch klinische Biomarker zum Monitoring des Verlaufs von Immuntherapie festzulegen, zeigte zum Beispiel für IgG Subtypen vielversprechende Ergebnisse. Die Analysen von Th1- oder Th2-assoziierten Zytokinen als Erfolgsmarker waren jedoch teilweise widersprüchlich und konnten die Erwartungen nicht bestätigen (Shamji et al., 2017).

In der folgenden Arbeit wird durch besonderes Augenmerk auf den Einfluss der Immuntherapie bei teils- bis volltherapierten Patienten auf die Th2- und Th9-Zellpopulationen versucht, mehr Klarheit in die Frage zu bringen, welche Vorgänge bei der Immuntherapie eine Rolle spielen und welche Folgen diese auf bestimmte Biomarker hat. Auch möchte ich mit dieser Arbeit die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der lokalen und systemischen Reaktion bei immuntherapierten Patienten genauer untersuchen.

1.4 Sputum

Um Zellen aus der Lunge zu generieren, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Goldstandard ist die bronchoalveoläre Lavage (BAL). Dabei wird mit Hilfe eines Bronchoskops Material von den peripheren Atemwegen wie den terminalen Bronchiolen und den Alveolen gewonnen (Tötsch, Guzman, Theegarten, Schmid, & Costabel, 2007). Jedoch ist diese hoch-invasive Untersuchung nicht ohne Risiken. So kann es unter anderem zu Verletzungen der Atemwege durch die Einführung der Instrumente kommen, sowie zu passagerer Hypoxie oder zu reflektorischen Bronchospasmen (Patel PH, 2019). Zusätzlich wird diese Untersuchung in der Regel in Vollnarkose durchgeführt, was zusätzliche Risiken birgt.

Eine Alternative zur BAL ist die minimal-invasive Methode des induzierten Sputums, welche die Gewinnung von Atemwegszellen bis in die 14. Bronchiengeneration erlaubt. Die Sputuminduktion erfolgt bei vollem Bewusstsein durch Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung über einen definierten Zeitraum mit anschließend aktivem Abhusten des Sekrets durch den Patienten selbst.

Unter induziertem Sputum versteht man Sekretionen der unteren Atemwege. Es besteht in erster Linie aus Bestandteilen bronchialen Sekrets und enthält Entzündungszellen aus dem zentralen Atemwegsepithel wie Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile, Eosinophile und Basophile, aber mit einem geringen Anteil auch squamöse Zellen. Induziertes Sputum eignet sich somit, um eine Art "Schnappschuss" des aktuellen lokalen Entzündungsgeschehens in der Lunge zu erhalten.

Bei der Sputumgewinnung ist es wichtig, darauf zu achten, Verunreinigungen aus Mund- und Rachenraum sowie durch die Nasenschleimhaut möglichst gering zu halten.

Ergebnisqualität und Vergleichbarkeit der Proben erreichte man im Laufe der Forschung durch ein standardisiertes Protokoll zur Induktion und Aufreinigung des Sputums. So bewährte es sich, selektierte Sputumplugs (Pfropfen) zur Analyse zu verwenden und die Proben so weit wie möglich von der Saliva zu trennen, die häufig zu Verunreinigungen mit Plattenepithelzellen führt

(Baumann et al., 2021; E. Pizzichini, Pizzichini, Efthimiadis, Hargreave, & Dolovich, 1996; U. M. Zissler et al., 2018). Auch die Wirksamkeit des Agens DTT in Form von Sputolysin zur Aufspaltung der Disulfidbrücken zur besseren Verarbeitung des Sputums konnte bestätigt werden (U. M. Zissler, 2012). Nach entsprechender Aufreinigung kann das Sputum für verschiedenste Analysen wie Zellzählung, durchflusszytometrische Untersuchungen sowie Transkriptome mittels PCR und Microarrays verwendet werden.

Studien zeigten, dass die Ergebnisse einer Sputuminduktion durchaus mit denen einer bronchoalveolären Lavage vergleichbar sind und unterstreichen damit die Aussagekraft dieser Methode (Blau et al., 2014; J. V. Fahy, Wong, Liu, & Boushey, 1995).

Es gibt bereits einige Studien, die anhand von induziertem Sputum die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge untersucht haben (Panzner et al., 2015; U. M. Zissler, 2012).

Somit hat sich das induzierte Sputum als eine valide Methode bewährt, um sich ein Bild der aktuellen entzündlichen Geschehnisse in der Lunge zu machen, die bei aerogen-getriggerten Allergien Eintrittspforte des Allergens ist. Anders als bei der Untersuchung im Blut, wo man die systemischen Folgen der Entzündung genauer ins Auge fassen kann, bietet die Analyse des Sputums eine Momentaufnahme der lokalen Vorgänge vor Ort, wo die allergische Reaktion ihren Anfang nimmt. Somit erweist es die idealen Voraussetzungen für den Vergleich der lokalen zur systemischen Immunantwort, bei der in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf Th2-, Th9-Zellen und regulatorischen T-Zellen gelegt wurde.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden folgende Inhalte behandelt:

- Die durchflusszytometrische Analyse von Sputum und PBMCs erfolgt mit Fokus auf die Rolle von Th9-, Th2- und Treg-Zellen, um einen Einblick in die systemische und lokale Entzündungsreaktion bei Patienten mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma zu erhalten. Besonderes Augenmerk liegt dabei bei den Patientengruppen mit erfolgter AIT.
- Die Charakterisierung von Proteinen in den Sputum-Überständen im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen während sowie auch außerhalb der Pollensaison. Es soll untersucht werden, ob die Zytokinlevel die Ergebnisse der Durchflusszytometrie widerspiegeln.
- Die Zytospinauszählung der Sputumproben als Goldstandard zur Zelldifferenzierung soll zusätzlich zu den klinischen Parametern dazu dienen, die jeweiligen Probandengruppen besser zu charakterisieren.
- Korrelation der experimentellen Daten mit klinischen Ergebnissen: Analyse von Zusammenhängen zwischen lokaler und systemischer Zellantwort sowie klinischen Parametern wie dem mRQLQ- oder dem GINA-Score.

2. Material und Methodik

2.1 Materiallisten

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 1: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.

Angegeben werden Bezeichnung sowie Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platte	U-botton Non-Tissue Culture plate	BD Falcon
70µl Filter	Cell Strainer 70µm Nylon	BD Falcon
Adapter		REF SARSTEDT
Aliquot	1,5ml Safe Seal	SARSTEDT
Aliquot	2,0ml Safe Seal	SARSTEDT
Butterfly	Safety-Multifly-Kanüle	SARSTEDT
Blutabnehmeröhrchen	Vacutainer CPT	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Deckgläschen		
Einwegpipette	Pasteurpipette Plastik bis 3ml	neoLab
Facstubes groß	5 ml Polystyrene Round- Bottom Tube	BD Falcon
Facstubes klein		
Falcon Röhrchen 50ml		SARSTEDT
Gerüst für Zytospin	Zytospinhalter Shandon Cytoclip	Thermo Scientific
	Zytospinzentrifuge Cytospin 4	Thermo Scientific

Immersionsöl	Type N	Leica Microsystems
Impföse		
Klebefolie		
Objektträger	Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Scientific
Zellkulturschale	Petrischale D=100mm	TPP
Pipetten	10-100µl	eppendorf
	0,5-10µl	eppendorf
Pipetierhilfe	1000µl	eppendorf
	200µl	eppendorf
	10µl	eppendorf
Pricktestlanzette		Allergopharma
Pricktestlösung	108 Birke	Allergopharma
	Physiologische Kochsalzlösung	Allergopharma
	309 Katzenepithelien	Allergopharma
	Histamin 1+999	Allergopharma
	006 Gräser	Allergopharma
	708 Dermatophagoides farinae	Allergopharma
	725 Dermatophagoides pteronysinus	Allergopharma

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte.

Angegeben werden Bezeichnung sowie Hersteller.

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Computer	MacBookPro	Apple
Durchflusszytometer	BD LSR II Fortessa flow cytometer	BD Bioscience
Färbewanne (Pappenheimer)		
Kühlschrank -80°C		
Mikroskope	Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskope	Mikroskop	Leica
Pipette	1000µl	Eppendorf, Brand
Pipette	200µl	Eppendorf, Deutschland
Pipette	10µl	Eppendorf, Deutschland
Schüttler	rollermixer SRT9D	Stuart, UK
Transferpipette	20-200µl	Brand
Ultraschallvernebler	Pari Turbo Boy SX	PARI, Starnberg, Deutschland
Vortexer	Vortex- Genie 2	Scientific Industries
Waage	PB303 Delta Range	Mettler Toledo
Zählkammer	Neubauer Improved 0,0025mm	Marienfeld GmbH
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Thermo Scientific
Zentrifugen	380R	Hettich
Zentrifugen	5 U30R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifugen	Cytospin 4	Thermo Scientific

2.1.2 Reagenzien und Antikörper-Panel

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Reagenzien.

Angegeben werden Bezeichnung sowie Hersteller und Verdünnung (wenn durchgeführt).

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Aqua dest.			
Bronchodilatator	Sultanol Dosier- Aerosol - 100 µg Salbutamol/ Dosis	GlaxoSmithKline	
FACS- Puffer	10% FCS 0,02% NaAzid in PBS		
Fc-Rezeptor-Block	Tru-Stain	BioLegend	1:20 in PBS
FCS			10% in PBS
Fixierkonzentrat	FoxP3 Fixation/Permeabilization Concentrate	eBioscience, San Diego, CA, USA	1:4 mit Fixierlösung
Fixierlösung	FoxP3 Fixation/Permeabilization Diluent	eBioscience, San Diego, CA, USA	3:4 mit Fixierkonzentrat
Giemsalösung		Merck, Darmstadt	
May-Grünwaldlösung		Merck, Darmstadt	
Methanol		Fluka	
Millipore H2O			
NaAzid			0,02 % in PBS
Natriumchlorid		Klinikum rechts der Isar	-

lösung 3% zur Inhalation						Krankenhausapotheke
Natriumchlorid lösung 4% zur Inhalation						Klinikum rechts der Isar - Krankenhausapotheke
Natriumchlorid lösung 5% zur Inhalation						Klinikum rechts der Isar - Krankenhausapotheke
PBS						
PermWash Lösung						1:10 in Millipore H2O
RNA cell protect reagent	RNA Protect Cell Reagent					Quiagen
Sputolysin	Sputolysin Reagent					Merck, Darmstadt
Trypan-Blau	Trypan Blue Stain 0,4%					Gibco by life technologies 1:10 in PBS
Viability Stain	Fixable Viability Stain (FVS)					eBioscience, San Diego, CA, USA 1:1000 in PBS
Waschlösung	FACS-Clean					BD Bioscience
Waschlösung	FACS-Rinse					BD Bioscience
	Cytometer Setup&Tracking Beads					BD Bioscience

Tabelle 4: Übersicht der Panel.

Angegeben werden Fluorochrom sowie Hersteller, Klon und Verdünnung.

Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Verdünnung
CD3	APC-Cy7	BioLegends	HIT3	1:200
CD4	BV421	BD	RPA-T4	1:200
CD4	BV711	BioLegends	OKT-04	1:200
IL-9	eFluor710	eBioscience	MHD9D1	1:100
FoxP3	PerCP-Cy5.5	eBioscience	PCH101	1:50
GATA3	BV421	BioLegends	16E10A23	1:50
FVS510	HV510	BioLegends		1:1000

2.1.3 Programme

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Programme.

Angegeben werden Version sowie Hersteller.

Programme	Version	Hersteller
EndNote	Version X9.3.2	Clarivate Analytics
Excel	Version 16.16.27	Microsoft Office
FACS-Diva Software		BD Bioscience, USA/ Becton Dickensen, USA
FlowJo	FlowJo software	FlowJo, Ashland, OR, USA
GraphPadPrism	Prism software version 7 GraphPad software Inc.	La Jolla, CA, USA
Word	Version 16.16.27	Microsoft Office

2.2 Methoden

2.2.1 Probanden

2.2.1.1 Ethische Richtlinien

Die Studie wurde im Vorfeld von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München geprüft und genehmigt (5156/11). Die Probanden wurden sowohl schriftlich als auch mündlich aufgeklärt, wobei das Procedere, mögliche Risiken und die Ziele der Studie beschrieben wurden. Von jedem Probanden musste nach Richtlinien der Erklärung von Helsinki eine Einverständniserklärung vorliegen (World Medical, 2001). Die Studienteilnahme erfolgte freiwillig und es war für jeden Probanden jederzeit möglich die Studie abubrechen. Die vorgeschriebenen Kriterien zum Datenschutz waren zu jeder Zeit gewährleistet.

2.2.1.2 Probandengruppen

In diese Studie wurden 58 Probanden eingeschlossen, die über ein Jahr lang betreut wurden. In diesem Zeitraum wurden die Probanden zweimal einbestellt. Einmal in Graspollenflugsaison von Mai 2017 bis Anfang August 2017 (Graspollen-Saison) und das zweite Mal im Zeitraum von Oktober 2017 bis Februar 2018 (außerhalb der Graspollen-Saison). Mithilfe eines Pollenflugkalenders (PollenflugInformation, o.D.) konnte kontrolliert werden, dass in dieser Zeit auch ein Pollenflug vorhanden war und die Patienten somit einer Allergenexposition ausgesetzt waren bzw. man außerhalb der Graspollen-Saison von einer fehlenden Allergenexposition ausgehen konnte. Die Probanden wurden in eine gesunde Kontrollgruppe, eine Gruppe mit allergischen Rhinitikern und eine Gruppe mit allergischen Asthmatikern unterteilt. Bei den Patienten mit bestätigter Gräserpollenallergie unterschied man zusätzlich noch, ob sich diese einer allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) unterzogen hatten. Die Immuntherapie wurde in der Regel als subkutane Immuntherapie (SCIT) verabreicht. Einige Patienten hatten die Immuntherapie jedoch auch sublingual (SLIT) durchgeführt. Zur Vereinfachung und zum besseren Verständnis werde ich fortan die Bezeichnung „AIT“ für jegliche in

dieser Studie eingesetzte Immuntherapie verwenden. Es wurde nicht differenziert, wie lange die Patienten mit einer Immuntherapie behandelt wurden und ob diese bereits beendet war. Jedoch betrug die Mindestdauer der Therapie aller Teilnehmer mindestens ein Jahr.

Wie in der Abb. 4 zu sehen ist, waren während der Graspollen-Saison 26 Probanden in der Kontrollgruppe und insgesamt 34 Probanden auf die einzelnen Allergikergruppen aufgeteilt. Davor waren 9 Rhinitiker mit AIT und weitere 9 Rhinitiker ohne AIT. Bei den Asthmatikern waren in den Gruppen mit AIT und ohne AIT jeweils 8 Probanden eingeschlossen.

Außerhalb der Graspollen-Saison bestand die Kontrollgruppe aus 23 Probanden und die Allergikergruppen insgesamt aus 31. Diese wurden wiederum aufgeteilt auf 9 Rhinitiker mit AIT, 6 Rhinitiker ohne AIT, 9 Asthmatischer mit AIT und 7 Asthmatischer ohne AIT.

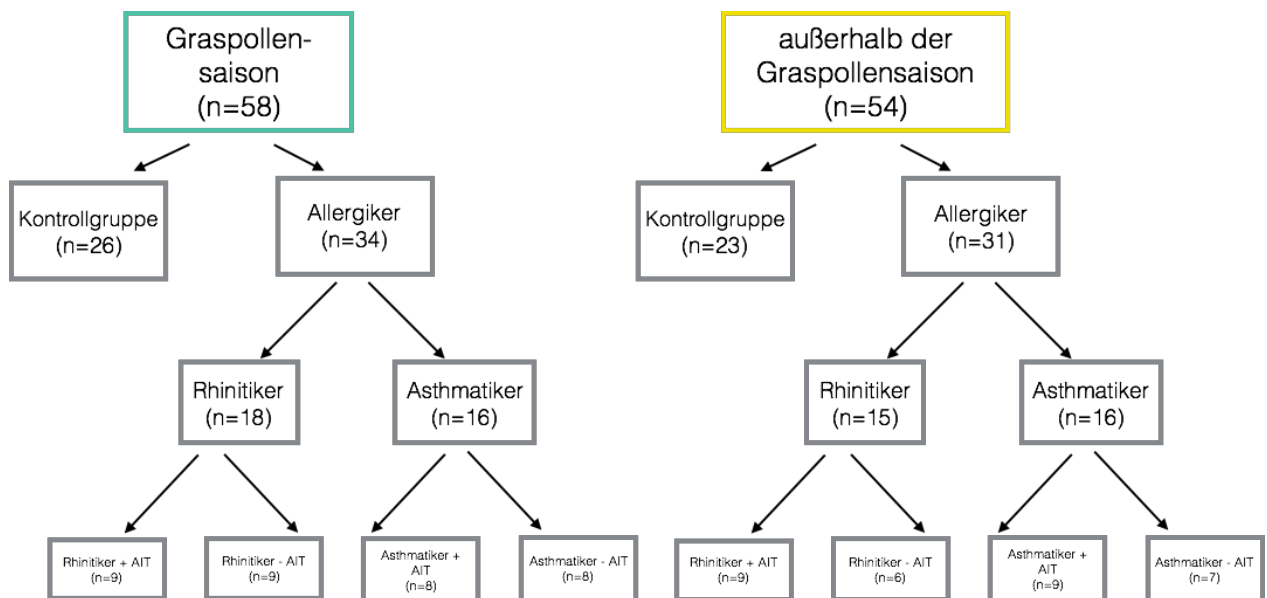


Abbildung 4: Probandengruppen.

Darstellung der Probandengruppen während und außerhalb der Pollensaison. Die Unterteilung der Allergiker erfolgte in Patienten mit allergischer Rhinitis angegeben als Rhinitiker, jeweils wieder unterteilt in Patienten mit erfolgter und ohne durchgemachter Immuntherapie (AIT), sowie in Patienten mit allergischem Asthma angegeben als Asthmatischer mit erfolgter und ohne durchgemachter Immuntherapie (AIT).

Nicht alle Probanden, die im Frühling/Sommer getestet wurden, konnten im Herbst/Winter wieder in die Studie aufgenommen werden. Auch wurden nach Analyse der Daten nur 58 Probanden während der Allergiephase in die Studie eingeschlossen. Vier Probanden konnten aus verschiedenen Gründen nur einmal in die Analysen miteinbezogen werden. Somit sind 54 von den 58 Probanden in beiden Phasen der Studie beteiligt, während die Proben der übrigen vier Probanden nur während der Graspollen-Saison analysiert wurden.

2.2.1.3 Probandencharakterisierung

Für die Diagnosestellung und Einteilung der Probanden in die jeweiligen Gruppen wurde ein Pricktest (>3mm) auf Gräser, Birke, Hausstaubmilben (*Dermatophagoides farinae* und *D. pteronyssinus*) und Katzenepithelien mit Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt sowie das spezifische IgE mithilfe des Radio-Allergo-Sorbent-Tests (RAST) und das Gesamt-IgE gemessen. In die gesunde Kontrollgruppe wurden nur Patienten ohne allergische Symptome und mit negativem Pricktest eingeschlossen. Des Weiteren musste jeder Allergiker einen mRQLQ ausfüllen: Rhinoconjunktivitis Quality of Life mini Questionnaire, der aus 28 Fragen besteht und 7 verschiedenen Bereiche abfragt wie Einschränkungen im Alltag, Schlafprobleme, Symptome der Augen, Nase oder anderweitig, praktische Probleme und emotionalen Einfluss der Allergie auf den Patienten (Juniper & Guyatt, 1991). Der Proband muss dabei mit einer Punktzahl von 0 für *nicht* bis 6 für *sehr stark* angeben, wie sehr er in jedem Bereich durch seine Allergie beeinträchtigt ist. Probanden der Asthma-Gruppe wurden basierend auf vorausgehender ärztlicher Diagnose und anamnestisch erhobenen Symptomen wie Atemnot, Husten und Engegefühl in der Brust in Zusammenhang mit Allergenexposition und/oder positivem Bronchodilatationstest dieser zugeteilt. Bei Patienten mit diagnostiziertem Asthma wurde der GINA Score angewandt und sichergestellt, dass es sich um ein kontrolliertes Asthma handelt (FEV1% > 70%). Alle Patienten wiesen anamnestisch seit mehr als zwei Jahren Symptome von Gräserallergie vor. Bei jedem Patienten wurde eine Lungenfunktion und eine Spirometrie durchgeführt. Die Lungenfunktion wurde mit Hilfe eines Handspirometers

(Jaeger SpiroPro; Würzburg, Deutschland) überprüft. Gemessen wurden die Vitalkapazität (FVC), die Einsekundenkapazität (FEV1), der Tiffeneau (FEV1/FVC) und der maximale expiratorische Fluss (Maximal expiratory flow, MEF25). Ein Reversibilitätstest mit Bronchodilatoren nach 400µg Salbutamolgabe wurde ebenfalls durchgeführt.

2.2.1.4 Ausschlusskriterien

Generelle Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, Alter unter 18 Jahren, Rauchen, akute Erkältungen, kardiopulmonale Instabilität oder andere systemische Erkrankungen. Am Tag der Probeentnahme wurde darauf geachtet, dass kein akuter Atemwegsinfekt vorlag und keine systemische Immuntherapie zu dem Zeitpunkt durchgeführt wurde, wie etwa systemische Kortisoneinnahme, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

2.2.2 Probengewinnung

Die Gewinnung der Blutproben sowie des Sputums nach Sputuminduktion eines Probanden erfolgten zum selben Zeitpunkt.

2.2.2.1 Venöse Blutentnahme

Bei jedem Probanden wurde Blut abgenommen und insgesamt 5 CPT-Röhrchen (Vacutainer CPT, BD biosciences, Heidelberg, Deutschland) möglichst gleichmäßig gefüllt. Die CPT-Röhrchen wurden gleich nach Abnahme bei 3000 rpm, bei 20°C für 20 Minuten zentrifugiert, um das Material für 24 Stunden zu stabilisieren.

2.2.2.2 Sputuminduktion und -gewinnung

Das Protokoll für die Sputuminduktion und -aufbereitung (siehe Abb. 5) wurde von Dr. Zissler im Zentrum für Allergie- und Umweltmedizin (ZAUM) weiterentwickelt (2012). Dem Protokoll folgend wurden immer zwei Probanden gleichzeitig induziert. Dadurch erreichte man mit zwei Durchläufen die Probengewinnung von vier Patienten pro Tag. Zu Beginn wurden die Vitalparameter (Blutdruck und Puls) bestimmt und eine orientierende Lungenfunktionstestung durchgeführt mit der Bestimmung der Vitalkapazität

(FVC), der Einsekundenkapazität (FEV1), des Tiffenauwertes (FEV1/FVC) und des maximal expiratorischen Flusses (MEF25%).

Um die Gewinnung des Sputums zu ermöglichen, erfolgte eine Induktion durch die Inhalation von Kochsalzlösungen. Zuvor wurden drei Lungenfunktionstestungen durchgeführt und es erfolgte eine Inhalation mit 400µg Salbutamol (kurzwirksames β -Mimetikum) zur Bronchodilatation. Die Messungen wurden 15 Minuten nach Einnahme des Salbutamols wiederholt. Zur Sicherheit für den Probanden wurde der höchste FEV1 Wert als Richtwert im folgenden Procedere herangenommen. Fiel während der Induktion dieser Wert um mehr als 10% ab, sollte die Lungenfunktionsmessung dreimal wiederholt werden. Bestätigte sich der abgefallene FEV1 Wert, musste der Vorgang der Induktion abgebrochen werden und dem Patienten Salbutamol verabreicht werden. Bei einer Abnahme von mehr als 20% der FEV1 sollte die Induktion sofort abgebrochen werden.

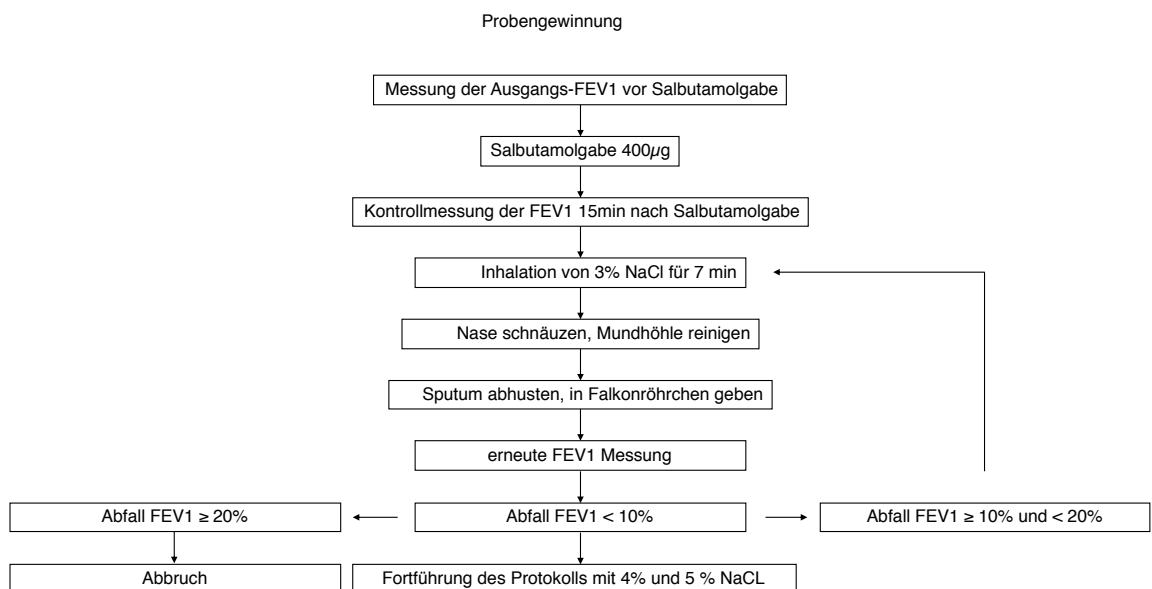


Abbildung 5: Protokoll der Probengewinnung.

*Ablauf der einzelnen Schritte bei der Probengewinnung von induziertem Sputum.
Modifiziert nach (U. M. Zissler, 2012)*

Die Induktion sieht eine dreimalige Inhalation über den Ultraschallvernebler Pariboy (PARI Starnberg, Deutschland) von Kochsalzlösung vor mit aufsteigender Konzentration von 3% auf 4% bis zu 5% für jeweils 7 Minuten. Nach jeder Inhalation wurde darauf geachtet, dass der Proband Nase und Mund reinigt, durch die Nase schnäuzt und den Mund nach gründlichem Gurgeln ausspült. Dies hat den Zweck, die Sputumprobe möglichst frei von Plattenepithelzellen aus dem Rachenraum zu halten. Dann sollte das Sputum in ein steriles Falkonröhrchen abgehustet werden. Nach jeder Sputumabgabe erfolgte eine Lungenfunktionsmessung zur Kontrolle des FEV1. Dann wurde der Vorgang mit der stärker konzentrierten Kochsalzlösung wiederholt.

2.2.3 Sputumaufbearbeitung

Das Sputum wurde nach der Entnahme auf Eis aufbewahrt und innerhalb von möglichst zwei Stunden aufbearbeitet, da die Qualität des Sputums im Laufe der Zeit und bei Raumtemperatur abnimmt. Verzögerungen der Aufbearbeitung führen dazu, dass vermehrt Zellen absterben und RNA/Proteine degenerieren. Erfolgreich gewonnenes Sputum der Kontrollgruppe (n=24; 92.3%) und der allergischen Probanden (n=34; 89.4%) wurde nach dem Protokoll von Dr. Zissler (siehe Abb. 6) verarbeitet (2018).

Das gewonnene Sputum wurde gewogen und dann mit Hilfe einer Impföse und einer Pipette von der Saliva getrennt. Das daraus sich ergebende Gewicht an Sputum wurde ausgerechnet und mit der vierfachen Menge einer 1:10 (v:v) Sputolysinlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) verdünnt.

Durch vorsichtiges Aspirieren mit einer Pipette und Vortexen von 15 Sekunden wurde das Sputum mit der Sputolysinlösung durchmischt. Anschließend wurde die Probe auf einem Schüttler (rollermixer SRT9D, Stuart, Großbritannien) bei 4°C für 15 Minuten lang inkubiert. Nach der 15-minütigen Inkubation wurde zu dieser Lösung die zweifache Menge des Sputumgewichts an Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) hinzugefügt. Erneut wurde die Probe für 15 Sekunden gevortext und je nach Viskosität eventuell zusätzlich 5 Minuten auf Eis gelegt.

Bei Erreichen der gewünschten Viskosität wurde die angefertigte Sputumlösung durch einen 70µm Filter (Cell Strainer 70µm Nylon, BD Falcon)

in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Durchgängigkeit des viskösen Sputums zu verbessern, wurde der Filter mit PBS angefeuchtet. Nach Berechnung des Gewichts der nun übrig gebliebenen Lösung wurden 10µl davon für die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer (nach Neubauer) mit der Trypan-Blau-Methode verwendet.

Die Trypan-Blau-Methode sieht vor, dass die 10µl Probe mit 10µl Trypanblau verdünnt werden. Diese Mischung wird in das Hämozytometer gefüllt und die Zellzählung in allen vier Quadranten durchgeführt. Lebende Zellen erschienen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Trypanblau dringt bei toten Zellen durch defekte Zellmembran und färbt diese Zellen tiefblau. Trypanblau wirkt toxisch und führt bei zu langem Einwirken zu einem Anstieg an toten Zellen. Darum wurde jede Zählung innerhalb von 5 Minuten durchgeführt. Es wurde zwischen lebenden und toten Leukozyten sowie squamösen Zellen differenziert. Kamen mehr als 200 Zellen pro Quadrant vor, wurde die Lösung nochmal mit PBS verdünnt und erneut gezählt, um Zählfehler zu reduzieren. Der Durchschnittswert der Zellen pro Quadrant wurde berechnet und der prozentuale Anteil von lebenden und squamösen Zellen wurde ermittelt.

Die restliche Probe wurde bei 4°C mit ausgeschalteter Bremse 10 Minuten lang bei 2000 rpm zentrifugiert, um einen zell- und ablagerungsfreien Überstand zu erhalten. Dieser Überstand wurde in 5 Aliquots zu je 1000µl abgefüllt. Diese wurden beschriftet und umgehend bei -80°C eingefroren.

Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension auf $0,5 \times 10^6$ Zellen in PBS aufgelöst. Diese Lösung wurde für die Herstellung von Zytospins verwendet. Pro Probe wurden vier Zytospins angefertigt. Jeweils zwei mit 75µl und zwei mit 100µl, die dann für 6 Minuten bei 450 rpm zentrifugiert wurden. Sollten die Objektträger eine zu hohe Dichte aufweisen, musste die Zellsuspension weiter verdünnt werden. Die Objektträger wurden, nachdem sie ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur trocknen konnten, für 10 Minuten in Methanol fixiert. Dann sollten sie nochmal 30 Minuten lang bei Raumtemperatur trocknen und wurden dann für die Zytospinauswertung aufbewahrt.

Mindestens 500.000 Zellen wurden in 1ml RNAprotect cell Reagenz (Qiagen) resuspendiert und bei -80°C konserviert.

Die restlichen Zellen, das heißt abzüglich der Zellen für die Zellzählung, die Zytospins und der 500.000 Zellen für RNA-Analysen, wurden für das Antikörper-Staining der Panels vorbereitet.

Pro Probe wurden zwei Wells einer 96-Well-Platte gefüllt: eines für die gefärbte und ein anderes für die ungefärbte Probe. Es wurden so viele Zellen wie möglich eingesetzt. Je nach Qualität und Menge des gewonnenen Sputums variierte die Zahl zwischen 400.000 bis zu 2 Millionen Zellen pro Well, jeweils aufgelöst in 100µl PBS.

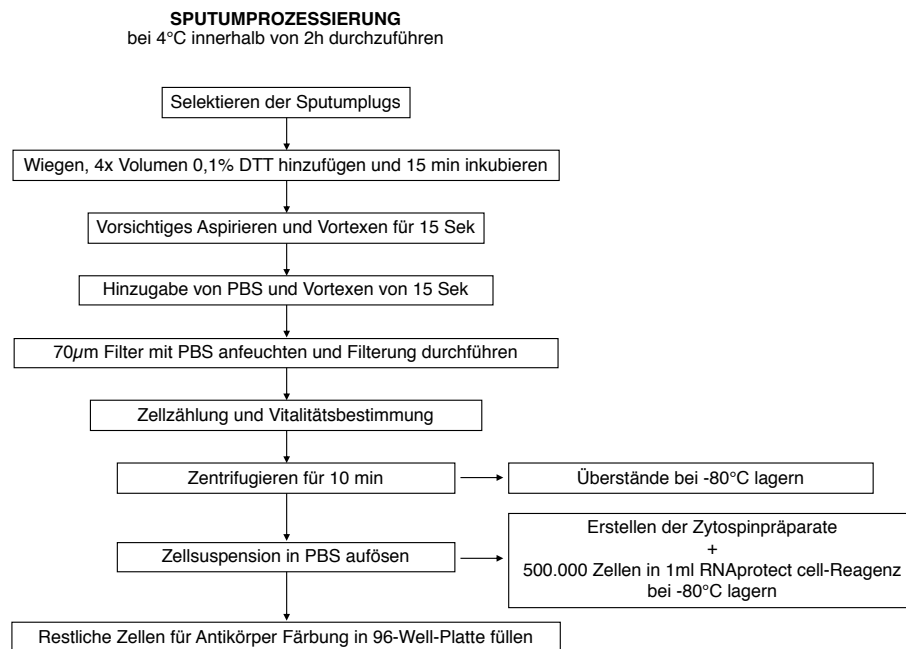


Abbildung 6: Protokoll der Sputumprozessierung.

Ablauf der Aufbearbeitung der Sputumproben. Modifiziert nach (U. M. Zissler, 2012)

2.2.4 PBMC Isolierung

Das Blut der Patienten wurde in jeweils 5 Vacutainer CPT (BD biosciences, Heidelberg, Deutschland) abgenommen und in diese jeweils möglichst gleichmäßig gefüllt. Innerhalb von 30 Minuten wurden die Röhrchen bei 3000 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Vorgang ermöglicht es, die Zellen im Serum für 24 Stunden bei Raumtemperatur lagern zu können, ohne dass diese

an Qualität verlieren. Nichts desto trotz wurden alle Blutproben innerhalb weniger Stunden weiter verarbeitet.

Vor Beginn der Isolierung der PBMCs wurden der Überstand der CPT-Röhrchen durch 180°-Drehungen gemischt und dann der Überstand aus allen 5 Röhrchen in ein steriles 50ml Falcon-Röhrchen zusammengeführt. Dieses wurde dann bei 1200 rpm für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert.

Vom dadurch entstandenen Überstand wurden je 5 Aliquots (1,5ml Safe Seal, SARSTEDT) mit je 1000µl Serum aufgefüllt und bei -80°C eingefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zuerst mit 1ml PBS vorsichtig gelöst und dann mit 50ml PBS verdünnt. Erneut wurde eine Zentrifugation mit 1200 rpm für 10 Minuten bei 20°C durchgeführt und der Überstand verworfen. Wieder wurde das Zellpellet mit 1ml PBS vorgelöst und dann mit 10ml PBS ergänzt.

Von dieser Lösung wurden 10µl mit 90µl Trypanblau-Lösung vermischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben zur Auszählung der Zellen nach derselben Vorgangsweise wie bei den Zellen aus dem Sputum. Bestimmt wurde die Zellzahl pro ml und die Gesamtzellzahl.

Dann wurden für jede Patientenprobe zwei Wells einer 96-Well-Platte gefüllt für eine gefärbte und eine ungefärbte Probe für das Antikörperfärben. Jedes Well enthielt dann 1,5 Millionen Zellen in 100µl PBS.

2.2.5 Erstellung des Panels

Um über Oberflächenmoleküle sowie über intrazelluläre Marker und auch über Transkriptionsfaktoren eine genauere Klassifizierung der vorhandenen Zellen zu generieren und die Th9-Zellen zu identifizieren, wurde ein Panel mit acht Antikörpern erstellt.

Die Oberflächenmoleküle CD4 und CD3 wurden gewählt, um im Durchflusszytometer gezielt Th-Zellen zu analysieren. IL-9 dient zur Identifizierung von Th9-Zellen, GATA3 als Haupttranskriptionsfaktor von Th2-Zellen und FoxP3 als Marker um T-regulatorische Zellen zu filtern. Alle oberflächlichen und intrazellulären Marker sowie die Transkriptionsfaktoren sind in Tab. 4 (siehe 2.1 Materialliste) aufgelistet.

2.2.6 Oberflächen- und intrazelluläres Staining

Das im Folgenden beschriebene Staining erfolgte sowohl für die aufgereinigten Zellen aus dem Sputum als auch für die aus dem Patientenblut isolierten PBMCs.

Eine 96-Well-Platte enthielt somit pro Probe zwei Wells, um eines davon mit dem Antikörper-Panel zu färben und das andere als Kontrolle ungefärbt zu lassen. Für die spezifischen Antikörper wurde das Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA, USA) nach Anweisung des Herstellers verwendet.

Die 96-Well-Platten wurden dann bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Jedes Well wurde mit 50µl Fc-Rezeptor-Block versehen und resuspendiert. Dabei wurde TruStain (BioLegend, USA) in einem Verhältnis von 1:20 (v:v) in PBS verdünnt. Dann wurde die Platte für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Wells mit jeweils 200µl PBS aufgefüllt, die Platte bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Im nächsten Schritt wurde nur auf die Probe, die gefärbt werden sollte, 50µl Fixable viability Stain (FVS510 BioLegend, USA) gegeben und resuspendiert. Das FVS wurde immer frisch auf kaltem PBS in einer Verdünnung von 1:1000 angesetzt. Nach 10-15 Minuten Inkubation bei 4°C wurde zu jedem Well 200µl PBS dazugegeben, die Platte bei 1200 rpm 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Jeder gefärbten Probe wurden nun die Antikörper für das Markieren der Antigene auf der Zelloberfläche, die zuvor im Verhältnis 1:200 in kaltem FACS-Puffer angesetzt worden waren, hinzugefügt. Nach sorgfältiger Resuspension wurde die Platte für 30 Minuten bei 4°C gelagert, 200µl kaltes FACS-Puffer zu jedem Well hinzugefügt, das Ganze bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Darauf wurde jedes Well mit 100µl der Fixierlösung (FoxP3 Fixation/Permeabilization Concentrate und FoxP3 Fixation/Permeabilization Diluent im Verhältnis 1:3) aufgefüllt und resuspendiert. Dieses Mal erfolgten die 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nach dem Waschschriff mit 100µl PermWash-Lösung, Abzentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde jedes Well wieder mit 100µl PermWash aufgefüllt. Die Platte wurde mit

einer Folie versiegelt und lichtgeschützt bei 4°C über Nacht gelagert. Die Mindestinkubationszeit sollte 8 Stunden betragen.

Am Folgetag wurde das Intrazellulärstaining durchgeführt. Bevor die intrazellulären Antikörper hinzugefügt werden konnten, musste die Platte erst wieder bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgeworfen werden. Die Zytokine wurden 1:100 und die Transkriptionsfaktoren 1:50 in PermWash angesetzt und dann auf jede gefärbte Probe als Intrazellulär-Antikörperfärbelösung in der Menge von 50µl hinzugegeben. 30 Minuten mussten die intrazellulären Antikörper im Well bei Raumtemperatur inkubiert werden, bevor wieder ein Waschschriff mit 100µl kalter PermWash-Lösung erfolgte. Die Platte wurde bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Wells wurden schließlich mit 100µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen mit 200µl FACS-Puffer überführt.

Dann erfolgte das Einlesen in das Durchflusszytometer BD LSR II Fortessa flow cytometer (BD Bioscience).

Das Fixable viability Staining (FVS) (eBioscience, San Diego, CA, USA) ist eine Methode, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Laut Hersteller enthält das FVS einen Farbstoff, der an extra- und intrazelluläre Amine bindet. Ist die Zellmembran durchgängig, wie es der Fall bei nekrotischen Zellen ist, weist diese Zelle einen sehr viel höheren Anteil dieses Farbstoffes vor. Lebende Zellen haben eine intakte Zellmembran und färben sich folglich nicht so stark an. Anhand des Farbstoffanteils kann man die Zellen in vitro die Eigenschaft lebend oder tot zuordnen. Dies spielt beim Gating der Ergebnisse des Durchflusszytometers eine entscheidende Rolle.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Die Analyse der aus Sputum und PBMC gewonnenen Zellen erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers BD LSR II Fortessa (BD Bioscience). Durch Laserstrahlen und fluoreszierendem Licht kann dieses Messgerät Aussagen über die Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität von Partikeln, in diesem Fall von Zellen, machen. Die Zellen werden in einer Flüssigkeit, hier FACS-Puffer, transportiert. Auf diesen Fluss trifft der Laserstrahl und wird von den

Partikeln in der Flüssigkeit abgelenkt. Ein Raster detektiert die Streuung des Laserstrahls und kann somit die Oberflächenbeschaffenheit, Größe, Form und internen Charakteristika der Zelle erkennen. Anhand dieser Daten kann bestimmt werden, um welche Zellen es sich handelt. Eine weitere Informationsquelle sind fluoreszierende Stoffe, die an und in der Zelle in Form von fluoreszenzmarkierten Antikörpern angebracht wurden. Die Lichtenergie, die von den fluoreszierenden Stoffen in einer für sie charakteristischen Wellenlänge absorbiert wird, führt im weiteren Schritt zu einer Energiefreisetzung in Form eines Lichtphotons. Diese Photone können wiederum von einem Detektorsystem registriert werden und genauere Angaben über die Beschaffenheit der Zelle liefern. Die aus dem Sputum und Blut extrahierten Zellen wurden von uns mit Antikörpern fluoreszenzmarkiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers ausgewertet. Zur Registrierung der Daten wurde die FACS Diva Software (Becton Dickensen, USA) benutzt.

2.2.7.1 Kompensation und Kontrollen

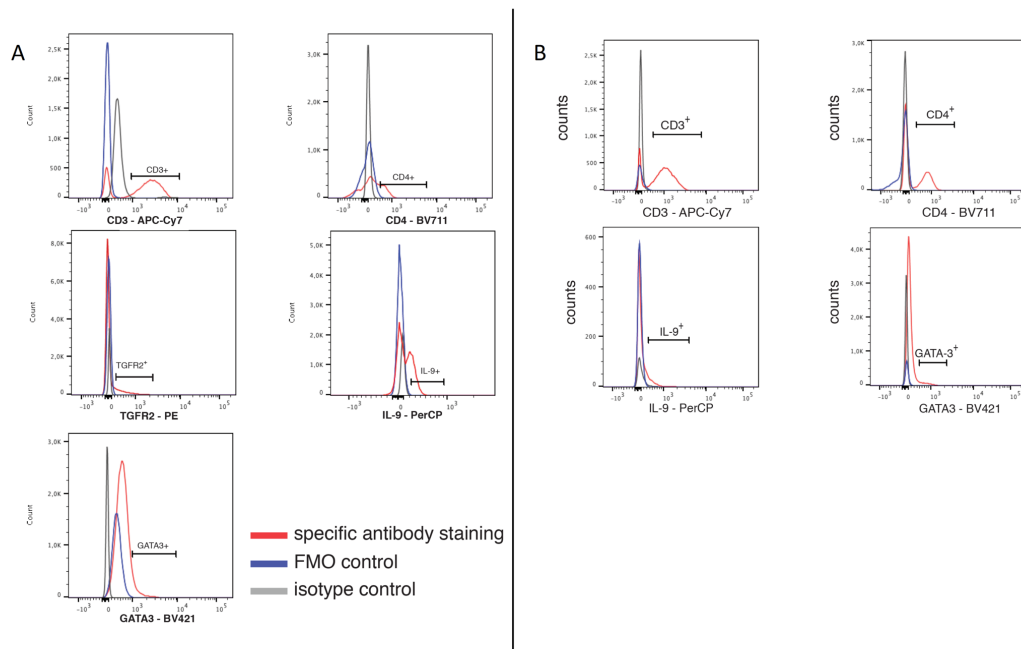


Abbildung 7: Kontrollfärbung für Th2- und Th9-Zellen für PBMC (A) und Sputum (B).

Die spezifische Antikörperfärbung ist in Rot angegeben, in Blau die FMO- Färbung und in Grau die Isotypen-Kontrolle.

Zu Beginn der Graspollen-Saison und der Winter-Saison wurde jeweils eine Kompensation durchgeführt, um zu verhindern, dass sich überlappende Fluoreszenzspektren die Ergebnisse verzerren. Die Kontrollfärbungen wurden sowohl für Th2, Th9 (Abb. 7) als auch für Tregs (Abb. 8) für jeweils PBMC und Sputum durchgeführt.

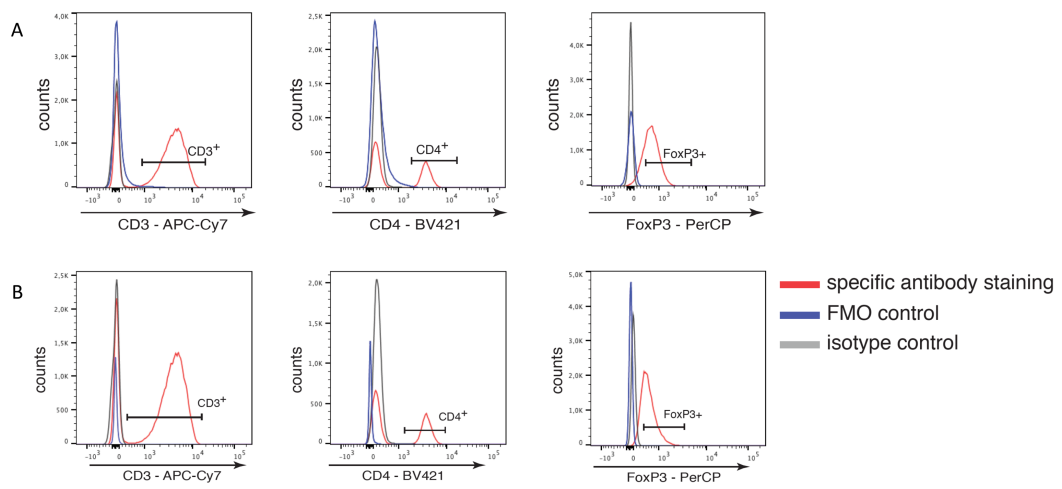


Abbildung 8: Kontrollfärbung für regulatorische T-Zellen für PBMC (A) und Sputum (B).

Die spezifische Antikörperfärbung ist in Rot angegeben, in Blau die FMO- Färbung und in Grau die Isotypen-Kontrolle.

Für die Kompensation wurden Kompensationsbeads verwendet. Diese Mikropartikel binden Antikörper mit einer konstanten Autofluoreszenz und liefern dadurch die Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle werden Beads verwendet, die keine Antikörper binden. Um eine möglichst genaue und fehlerfreie Auswertung zu gewährleisten, wurden mehrere Kontrollverfahren durchgeführt: pro verwendeten Antikörper eine ungefärbte Kontrolle zum Vergleich, ein Isotypen Staining und ein Fluorescence Minus One (FMO) Staining.

2.2.7.2 Gating Strategien

Zusätzlich zu den oben genannten Kontrollmaßnahmen wurden die Resultate der Durchflusszytometrie noch gefiltert, um das Ergebnis genau auf jene Zellen einzuschränken, die man untersuchen will. Dieses Filtern wird auch Gating genannt und sieht eine Strategie vor, um gezielt spezifische Zellen aus all den erfassten Partikeln herauszusuchen.

Wichtig für die Auswertung ist ein identisches Gating, das in jeder Analyse angewandt wird, um dieselben Voraussetzungen zu garantieren und einen Vergleich zwischen Sputum (0.5×10^6 Zellen) und PBMC (2.0×10^6 Zellen) zu ermöglichen. Dieses Vorgehen lässt somit einen direkten Vergleich der lokalen sowie der systemischen Reaktion zu. Weil Messungen an Zellen aus dem Sputum aufgrund dessen Viskosität schwieriger sind, wurde in diesem Falle die Gating-Strategie im Backgating ein weiteres Mal angewandt.

2.2.7.2.1 Th9-Gating und Th2-Gating

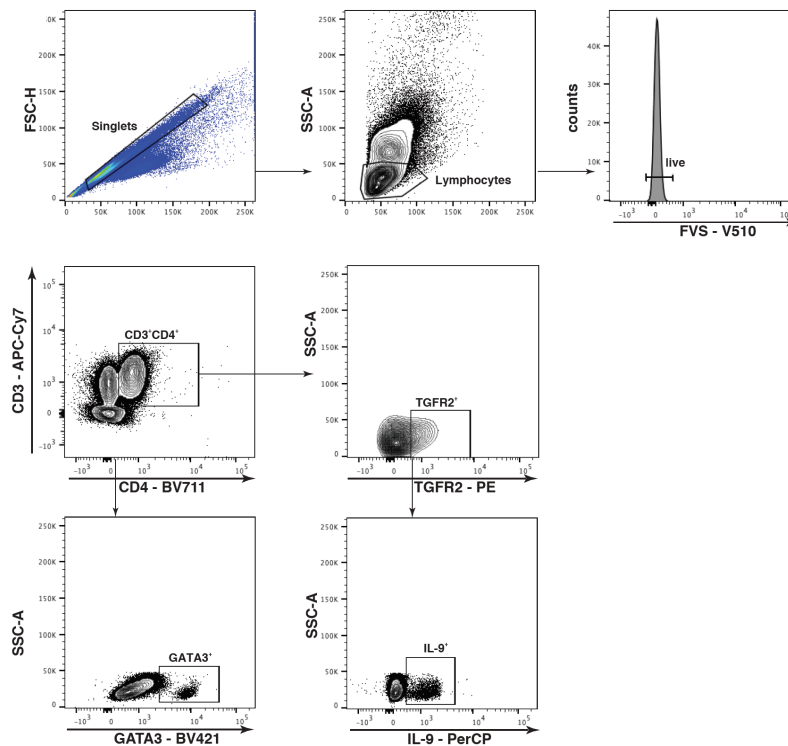


Abbildung 9: Gating für Th2- und Th9-Zellen für PBMC.

Es wurde zuerst auf Singlets gated, dann auf Lebendzellen, dann auf CD3 positive und CD4 positive Zellen. Für Th2-Zellen wurde zudem auf GATA3, für Th9-Zellen auf TGF β und IL9 gated.

Um Th9-Zellen herauszufiltern wurden folgende Schritte unternommen (siehe auch Abb. 9 und 10).



Abbildung 10: Gating für Th2- und Th9-Zellen für Sputum.

Das Gating erfolgte nach demselben Schema wie bei den PBMC-Proben. So wurde zuerst auf Singlets gated, dann auf Lebendzellen, dann auf CD3 positive und CD4 positive Zellen. Für Th2-Zellen wurde schließlich auf GATA3, für Th9-Zellen auf TGF β und IL9 gated.

Zuerst wurde sichergestellt, dass nur einzelne Zellen und keine Zellcluster mit ausgewertet werden. Dann erfolgte das Gating auf Lymphozyten, von denen nur lebende Zellen in Frage kamen. Der FVS ist ein intrazellulärer Marker, der die Zellmembran passieren kann, wenn sie wie bei toten Zellen nicht mehr intakt ist. Somit wurden durch das Gating alle fixable viability stain positiven Zellen aus dem Auswertungspool entfernt.

Durch das Gaten auf CD3 und CD4 positive Zellen erhält man Th-Zellen. Alle Th-Zellen, die positiv auf IL9 waren, wurden zu den Th9-Zellen gezählt. Die Th-Zellen, die positiv auf GATA3 gegatet werden konnten, wurden als Th2-Zellen identifiziert.

2.2.7.2.2 Treg Gating

Hierfür wurde auf dem bereits oben genannten Schema basierend einzelne Zellen und keine Zellcluster, Lymphozyten, lebende Zellen und Gating auf CD3 und CD4 positive Zellen- mittels FoxP3 auf regulatorische T-Zellen gegatet (siehe Abb. 11 und 12).

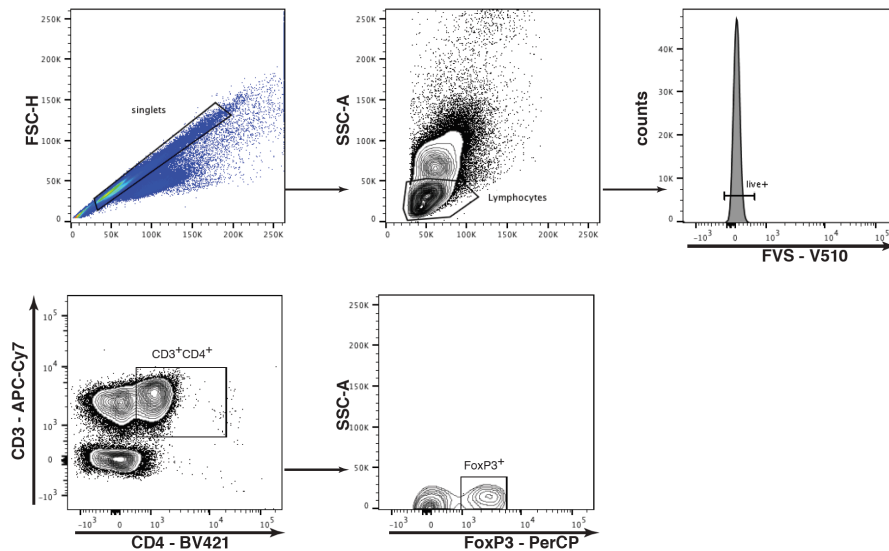


Abbildung 11: Gating für regulatorische T-Zellen für PBMC.

Es wurde zuerst auf Singlets gegatet, dann auf Lebendzellen, dann auf CD3 positive und CD4 positive Zellen. Das spezifische Gating für Treg-Zellen erfolgte anhand von FoxP3.

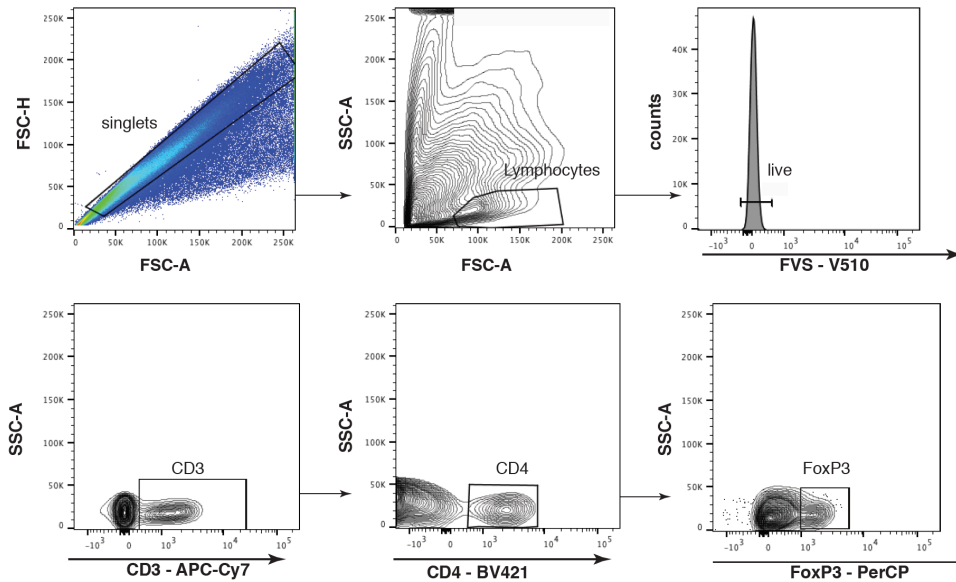


Abbildung 12: Gating für regulatorische T-Zellen für Sputum.

Es wurde zuerst auf Singlets gated, dann auf Lebendzellen, weiters auf CD3 positive und CD4 positive Zellen. Das spezifische Gating für Treg-Zellen erfolgte auch bei der Sputumanalyse anhand von FoxP3.

2.2.8 Zytospins

Bei Erstellung von Zytospins wird eine Zellsuspension mit Hilfe einer Zytospinzentrifuge sehr dünn auf ein Objektträger aufgetragen. Damit kann nach Anfärbung der Zellen eine genaue Analyse und Auszählung derselben erfolgen. Pro Proband lagen 4 Zytospins aus den aus dem Sputum gewonnenen Zellen vor. Jeweils zwei waren mit 100µl Zellsuspension und zwei mit 75µl Zellsuspension angefertigt worden. Im Lichtbildmikroskop wurde ausgewertet, welches dieser 4 am besten geeignet wäre für die Zellauszählung.

2.2.8.1 Anfärbung

Diese jeweils als am besten geeigneten ausgewählten Zytospins wurden mittels der Färbung nach Pappenheim angefärbt.

Dafür wurde zuerst die Giemsa-Lösung hergestellt in einer 1:5 Verdünnung und dann durch ein Papierfilter gefiltert. Die May-Grünwald Lösung wurde ebenfalls durch einen solchen Papierfilter gefiltert. Die erste Färbung mit der

May-Grünwaldlösung erfolgte für 8 Minuten. Es wurden immer gleichzeitig 8 Objektträger in einer Glaswanne gefärbt. Nach 8 Minuten wurden die Objektträger mehrfach sorgfältig mit Leitungswasser gespült, um überschüssige Farbreste zu entfernen, die das Auszählen später erschweren würden. Dann erfolgte der Giemsa-Färbeschritt für 35 Minuten. Auch hiernach wurden die Objektträger mehrmals mit Leitungswasser gespült. Dann wurden die Objektträger lichtgeschützt zum Trocken ausgelegt. Sobald die Objektträger völlig getrocknet waren, wurden sie für 10 Sekunden in Xylol getaucht. Im nächsten Schritt wurden drei Tropfen Eukitt auf den Objektträger gegeben, um das Deckgläschen als Schutzschicht darüber zu kleben. Wichtig ist dabei, Luftbläschen zu vermeiden, damit das genaue Auszählen gewährleistet werden kann.

2.2.8.2 Auszählung

Die Fläche auf dem Objektträger wurde in 4 Quadranten geteilt und in jedem Quadranten wurden unterm Mikroskop mit Öl mit 60facher Vergrößerung mäanderförmig die ersten 100 Zellen differenziert gezählt. Gezählt wurden dabei die nicht squamösen Zellen und diese wurden differenziert in Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Zelltypen wurde berechnet. Das Auszählen der Zytospins wurde von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse wurden verglichen und bei Abweichen des Varianzkoeffizienten von mehr als 5% wurde von einer dritten Person noch einmal nachgezählt.

2.2.9 Proteinanalysen aus Sputum-Supernatants

In den Sputa der Patienten mit allergischer Rhinitis oder allergischem Asthma wurden neun Biomarker identifiziert und mit denen gesunder Kontrollprobanden verglichen. Die gemessenen Zytokine wurden in Th9-assoziierte Zytokine (TGF β , IL-9), Th2-assoziiert (IL-4, IL-5, IL-13), antiinflammatorische Zytokine (IL-10), Th1-assoziierte Zytokine (IL2 und IFN γ) und proinflammatorische Zytokine (IL-6) eingeteilt (Tab. 6).

Die Messung der Zytokine in den Sputumüberständen wurde mit dem LegendPlex Kit TGFβ1 (BioLegend, CA, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Abb.13).

Tabelle 6: Übersicht der analysierten Zytokine.

Alle gemessenen Zytokine werden mit den ihnen zugeordneten Funktionen und assoziierten Zellen angegeben.

Produziert von	Zytokin	Bezeichnung	Funktion
Th2-Zellen	IL-4	Interleukin 4	Induktion der Th2-Zellreaktion und IgE-Klassenwechsel
	IL-5	Interleukin 5	Aktivierung der Eosinophilen
	IL-13	Interleukin 13	IgE-Klassenwechsel und Mukushypersekretion
Th9-Zellen	TGFβ	Transforming Growth Factor beta	Differenzierung der Th9-Zelle in Anwesenheit von IL-4
	IL-9	Interleukin 9	Induktion von Mastzellen, Eosinophilen und Th2-Zelldifferenzierung
Makrophagen, Neutrophile, Epithelzellen	IL-6	Interleukin 6	Kontrovers diskutiert pro/antiinflammatorisch
Th1-Zellen	IL-2	Interleukin 2	Antiinflammatorisch – Regulation von regulatorischen T-Zellen
	IFNγ	Interferon gamma	Antiinflammatorisch – Regulation von Th2-Zellen
Regulatorische T-Zellen	IL-10	Interleukin 10	Antiinflammatorisch, hemmt Makrophagenfunktion

Dieses ermöglicht ein Immunoassay, das nach demselben Prinzip arbeitet wie „Sandwich“ Immunoassays, wo ein löslicher Analyt zwischen zwei Antikörper

gebunden wird. Ein Antikörper-Bead-Komplex bindet spezifisch an das gesuchte Protein.

Die Beads haben verschiedenen Größen und APC Fluoreszenzen und lassen sich dadurch eindeutig voneinander unterscheiden. Jedes Bead exprimiert an seiner Oberfläche einen spezifischen Antikörper und kann somit an ein genau bestimmtes Protein binden.

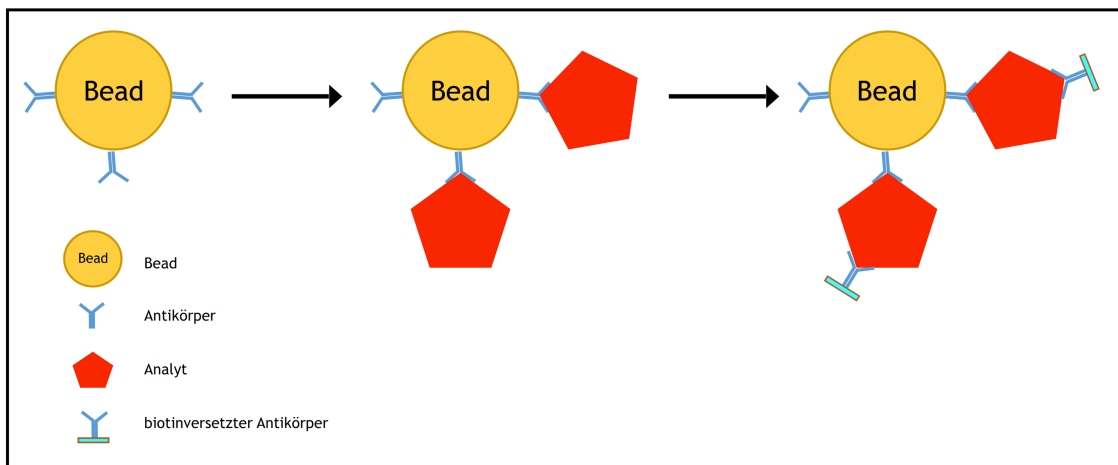


Abbildung 13: Immunoassay nach dem LegendPlex Kit.

*Prinzip der Messung der Zytokine in den Sputumüberständen mit dem LegendPlex Kit.
Modifiziert nach Herstellerwebsite (BioLegend)*

Versetzt man eine Probe mit unbekannter Menge der Zielproteine mit einem Panel ausgewählter Beads, werden diese Proteine an das passende Bead gebunden. Nach einem Waschschrift werden dieser Lösung biotinversetzte Antikörper hinzugefügt, die an den Zielprotein-Bead-Komplex binden. Dadurch entsteht ein Bead-Zielprotein-Antikörper Sandwich. Der fluoreszierende Farbstoff Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) bindet in einem nächsten Schritt an die biotinversetzten Antikörper. Die Intensität des fluoreszierenden Signals ist abhängig von der Menge des gebundenen Proteins. Dieses Signal kann dann durchflusszytometrisch eingelesen werden. Zur Auswertung der Konzentration eines bestimmten Analyten anhand einer Standardkurve wurde die LegendPlex data analysis Software verwendet.

Anmerkung: Normalerweise wird das TGF β für diese Art von Analyse immer extra angesäuert. In diesem Fall wurde aber unter Verwendung eines nativen Kits des Herstellers natives TGF β gemessen. Es kann dabei direkt im Sputumüberstand gemessen werden ohne erst herausgelöst werden zu müssen.

2.2.10 Statistische Tests zur Auswertung

Die experimentellen Vorgänge und Analysen wurden blind durchgeführt. Die Erfassung der Rohdaten erfolgte durch Übertragung der demographischen und klinischen Angaben und Messergebnisse in eine Excel-Tabelle. Für die statistische Analyse wurde GraphPadPrism, Version 7.0, verwendet.

Mit dem D'Agostino-Pearson Test wurden die Gruppen auf Normalverteilung überprüft. Bei Nicht -Normalverteilung der Gruppen folgte eine nicht parametrische Testung. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde zuerst mit dem Kruskal Wallis Test als ANOVA mit Bonferroni Korrektur vorgetestet, um einen Fehler der 1. Art zu vermeiden. Konnten in der Gesamtverteilung signifikante Unterschiede gemessen werden, wurden auch die einzelnen Gruppen gegeneinander getestet.

Bei Normalverteilung für unverbundene Gruppen wurde der Wilcoxon-Rang-Vorzeichentest verwendet, während bei verbundenen Gruppen entsprechend der t-Test für verbundene Stichproben angewandt wurde. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt ($p < 0,05$). In der graphischen Darstellung wird die Signifikanz durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt: „*“ $p < 0,05$, „**“ $p < 0,01$ und „***“ $p < 0,001$.

3. Auswertung und Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Von den insgesamt 64 Probanden, von denen klinische Daten und Patientenmaterial gesammelt wurden, konnten von 58 Probanden während der Graspollen-Saison und 54 außerhalb der Graspollen-Saison genügend Sputum gesammelt werden. Die Daten von vier Patienten konnten aufgrund mangelnder Probengewinnung in der zweiten Phase der Studie nicht mehr ausgewertet werden.

3.1.1 Altersverteilung und Geschlechterverteilung

Es nahmen Probanden im Alter von 19 bis 53 Jahren teil, wobei eindeutig der Großteil der Probanden (sowohl Kontrollprobanden als auch Allergiker) der Altersklasse 20-30 Jahre zuzuordnen war (siehe Tab. 7). Die Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppen ist in der Abb. 14 und in der Tab. 7 abzulesen.

Tabelle 7: Demographische Daten.

Das Alter der Probanden ist als Mittelwert (\pm Standardfehler), die Geschlechterverteilung in Prozent angegeben.

	Kontroll gruppe	Allergische Rhinitis ohne AIT	Allergische Rhinitis mit AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma ohne AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma mit AIT
Alter [Jahre]	27.2 \pm 1.3	28.7 \pm 2.2	26.4 \pm 1.6	26.5 \pm 1.0	26.0 \pm 0.7
Geschlecht [m/w in %]	42/58	22/78	40/60	60/40	67/33

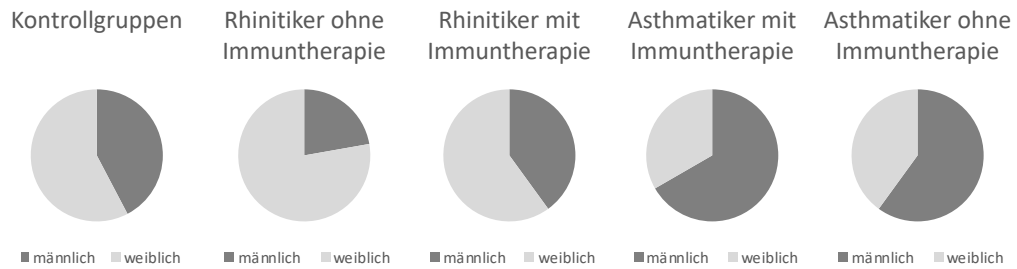


Abbildung 14: Geschlechterverteilung.

Diagramme zur Geschlechterverteilung in den einzelnen Probandengruppen. Angaben in Prozent.

3.1.2 BMI

Der Body Mass Index (BMI) berechnet sich aus der Körpergröße und dem Körpergewicht, entsprechend Körpergewicht (in kg) geteilt durch Körpergröße (in m) zum Quadrat. Als normwertig gilt laut Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) ein BMI von 18,5–24,9 kg/m² (WHO, 2021).

Das Probandenkollektiv zeigte sich auch bezüglich des BMIs sehr homogen. So liegt der Mittelwert bei 21,6kg/m²±2,5kg/m². Als geringster Wert wurde ein BMI von 17,5 kg/m² verzeichnet, als Maximalwert ein BMI von 33,15kg/m².

Betrachtet man die einzelnen Probandengruppen sieht man auch im Vergleich derselben sehr homogene Ergebnisse, siehe Tab. 8.

Tabelle 8: BMI.

Angaben zum Body Mass Index (BMI) des Probandenkollektivs und der jeweiligen Probandengruppen. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung in kg/m².

Probanden kollektiv	Kontroll gruppe	Allergische Rhinitis ohne AIT	Allergische Rhinitis mit AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma ohne AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma mit AIT	
BMI	21,6±2,5	21,1±1,9	21,7±2,0	21,8±2,6	23,2±4,0	21,6±1,9

3.1.3 Sputumqualität

Um die Qualität des gewonnenen Sputums nach Induktion zu verifizieren, kann das Sputum auf Anteil von Plattenepithelzellen und Lebendleukozyten untersucht werden (Murdoch et al., 2017; Ward, Woltmann, Wardlaw, & Pavord, 1999). Zu hohe Anteile an Plattenepithelzellen sprechen für Verunreinigung der Proben, zum Beispiel mangels ausreichendem Spülen des Mund- und Rachenraums oder Nase Schnäuzen. Eine hohe Anzahl toter Zellen kann durch zu lange Lagerung der Proben oder insuffiziente Kühlung der Proben entstehen. Aus diesem Grund wurde jede Sputumprobe auf Eis gekühlt und innerhalb von maximal zwei Stunden bearbeitet. Als Qualitätskriterium wurde ein Anteil squamöser Zellen von maximal 15% festgelegt. In der Literatur findet man Angaben, die bis zu 25% an squamösen Zellen reichen, um das Sputummateriale als geeignet zu bezeichnen (Weißgerber, 2013).

Bezüglich der Zellviabilität, also dem Anteil von Lebendleukozyten, finden sich in der Literatur Grenzwerte von 50% an Lebendleukozyten, die als Qualitätsmerkmal festgelegt wurden (Ward et al., 1999). In dieser Arbeit wurde ein Grenzwert von 60% bestimmt. Wie aus der Tab. 9 zu entnehmen ist, konnte insgesamt eine sehr gute Sputumqualität erzielt werden. In diesen Berechnungen sind auch diejenigen Proben enthalten, die aufgrund mangelnder Qualität nicht in die Studie mit eingeschlossen wurden. Bei weniger als 20% aller während der Graspollen-Saison entnommenen Proben wurde in der Sputumprobe ein höherer Anteil an Plattenepithelzellen als 15% gemessen. Außerhalb der Graspollen-Saison lag keiner der Probanden über diesem Grenzwert. Die Anteil der Proben mit Lebendleukozytenanzahl unter 60% lag während der Graspollen-Saison bei 26% aller entnommenen Proben. Außerhalb der Graspollen-Saison gab es keine Probe, die nicht innerhalb des Grenzwertes lag. Es zeigt sich also auch ein deutlicher Qualitätssprung von der ersten Probenentnahme während der Graspollen-Saison zum zweiten Durchgang außerhalb der Graspollen-Saison. Im Schnitt lag der Anteil der squamösen Zellen während der Graspollen-Saison bei 9,6% und außerhalb der Graspollen-Saison nur mehr bei 3,9%. Der Anteil der lebenden Leukozyten

und somit die Zellviabilität lag während der Graspollen-Saison im Schnitt bei 68,8% und stieg außerhalb der Graspollen-Saison auf 94,9% an.

Auch hier ist ein eindeutiger Anstieg der Qualität zwischen Graspollen-Saison und außerhalb bemerkbar. Insgesamt weisen diese Daten auf eine sehr hohe Qualität der Proben hin.

Tabelle 9: Angaben zur generellen Sputumqualität aller Proben.

Angegeben wurden der Anteil der Proben mit Anteil von squamösen Zellen >15%, der Anteil der Proben mit Lebendleukozyten <60% angegeben in Prozent, sowie der Mittelwert der squamösen Zellen der entnommenen Sputumproben in Prozent und der Mittelwert der lebenden Leukozyten in Prozent jeweils während und außerhalb der Graspollen-Saison.

	Graspollen- Saison	außerhalb der Graspollen-Saison
Anteil Proben mit squamösen Zellanteil > 15 % in %	19%	0
Mittelwert squamöser Zellen in %	9,6%	3,9%
Anzahl der Proben mit Lebendleukozytenanteil <60 % in %	26%	0
Mittelwert lebender Leukozyten in %	68,8%	94,9%

3.2 Klinische Daten

Im Probandenkollektiv wurden verschiedene klinische Daten erhoben (siehe Tab. 10), um einerseits die einzelnen Gruppen besser zu charakterisieren und andererseits die Ergebnisse der Blut- und Sputumuntersuchungen mit den klinischen Daten vergleichen zu können und Korrelationen zu untersuchen.

Tabelle 10: Klinische Charakterisierung.

Aufgelistet ist die klinische Charakterisierung des Probandenkollektivs während der Graspollen-Saison. Untersucht wurden der Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire, das Gesamt IgE und Lungenfunktionswerte wie die Einsekundenkapazität (FEV1), die Vitalkapazität (FVC) und der maximal expiratorische Fluss (MEF25) sowie die Auszählung der Zytospins. Angegeben sind die Daten mit dem Mittelwert (\pm Standardfehler).

	Kontroll gruppe	Allergische Rhinitis ohne AIT	Allergische Rhinitis mit AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma ohne AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma mit AIT
GINA Score	n.d.	n.d.	n.d.	1.1 \pm 0.4*	0.0 \pm 0.0
mRQLQ Score	1.2 \pm 0.2	2.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4
mRQLQ Score	0.1 \pm 0.1	1.3 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2
Einschränkung bei Freizeitaktivitäten					
mRQLQ Score	0.1 \pm 0.0	3.0 \pm 0.5	2.6 \pm 0.5	4.0 \pm 0.3	2.2 \pm 0.3
Alltagseinschränk ungen					
mRQLQ Score	0.2 \pm 0.1	2.8 \pm 0.5	2.3 \pm 0.5	3.6 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3
nasale Symptome					
mRQLQ Score	0.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.5	1.5 \pm 0.4	3.1 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3
Augen Symptome					
mRQLQ Score	0.3 \pm 0.1	1.8 \pm 0.5	1.2 \pm 0.3	2.9 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2

weitere Symptome					
IgE [IU/L]	n.d.	147.1±48.9	40.8±14.4	147.3±100.1	110.6±77.0
FEV1 [%]	100.6± 2.3	102.6±2.3	101.9±3.7	95.4±4.8	96.5±2.3
FEV1 [L]	3.7±0.2	4.2±0.3	3.9±0.1	3.8±0.2	3.5±0.2
FVC [%]	97.8±2.4	103.7±3.3	100.4±5.1	97.1±4.9	97.9±2.9
FVC [L]	4.4±0.2	4.7±0.4	4.5±0.2	4.5±0.3	4.3±0.2
MEF25 [%]	111.3±6. 8	96.2±10.9	101.4±8.0	99.9±6.7	93.1±6.5
MEF25 [L]	2.2±0.1	2.2±0.4	2.4±0.2	2.1±0.2	1.8±0.3
Totale Zellanzahl [x10⁴/mL]	47.3±8.7	134.2±31.4	42.8±9.3	178.1±94.8	19.6±2.9
Makrophage n [%]	84.9±3.0	87.0±2. 0	86.6±2.7	80.5±6.6	85.2±5. 8
Neutrophile [%]	14.0±3.0	9.5±1.4	11.3±2.1	15.5±4.7	14.2±5. 7
Eosinophile [%]	0.5±0.2	2.6±1.0	1.0±0.2	2.5±1.5	0.4±0.2
Lymphozyten [%]	0.6±0.3	0.9±0.2	1.1±0.1	2.3±1.3	0.2±0.2

3.2.1 Lungenfunktion

Jeder Proband wurde einer ausführlichen Lungenfunktionstestung unterzogen. Dabei wurden die Einsekundenkapazität (FEV1), die Vitalkapazität (FVC) und der maximal expiratorische Fluss (MEF25) gemessen. Die ermittelten Werte ergaben vergleichsweise homogene Ergebnisse. So zeigten sich nur minimale Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, siehe Tab. 10.

3.2.2 mRQLQ und IgE

Bei jedem Probanden wurde eine Kurzform des Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire, der miniRQLQ, erhoben (Juniper & Guyatt, 1991). Dieser spiegelt das klinische Bild und die Einschränkung durch die allergische Erkrankung des Patienten wider und umfasst folgende Punkte: Einschränkungen im Alltag, Symptome der Augen, Nase oder anderweitig, praktische Probleme und emotionalen Einfluss der Allergie auf den Patienten. Wie aus der Tab. 10 zu entnehmen ist, sieht man einen eindeutigen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den allergischen Gruppen. Betrachtet man die Gesamtauswertung des mRQLQ-Scores erscheinen die Gruppen recht homogen. So zeigt sich kaum ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ($1,2 \pm 0,2$) und den unbehandelten Asthmapatienten ($1,1 \pm 0,4$). Einzig die Gruppe der unbehandelten Rhinitispatienten ($2,5 \pm 0,3$) hebt sich hervor. Gliedert man den mRQLQ jedoch und analysiert ihn nach einzelnen Punkten, zeigen sich größere Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. So konnten bei keinem aus der Kontrollgruppe ($0,0 \pm 0,0$) Augensymptome erhoben werden, während bei den unbehandelten Rhinitikern ($2,0 \pm 0,5$; $p < 0.0001$) und unbehandelten Asthmatikern ($3,1 \pm 0,3$; < 0.0001) sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weitaus höhere Werte zeigten. Bezüglich der Augensymptome zeigen sich auch Unterschiede innerhalb der Allergikergruppen, im Speziellen zwischen behandelten ($1,5 \pm 0,4$) und unbehandelten Rhinitikern ($2,0 \pm 0,5$; $p < 0.05$) sowie zwischen behandelten ($1,5 \pm 0,3$) und unbehandelten Asthmatikern ($3,1 \pm 0,3$; $p < 0.001$). Die weiteren Ergebnisse der Analyse des mRQLQ-Scores sind aus der Tab. 10 zu entnehmen.

Bei jedem Probanden wurde zusätzlich zum mRQLQ-Score auch der Ig-E Wert im Blut gemessen. Hierbei hebt sich die Probandengruppe mit allergischer Rhinitis, wo keine Immuntherapie durchgeführt worden war ($147,1 \text{ IU/l} \pm 48,9 \text{ IU/l}$), mit signifikant höheren Werten von den Probanden mit Rhinitis, die sich einer Immuntherapie unterzogen hatten ($40,8 \text{ IU/l} \pm 14,4 \text{ IU/l}$), ab ($p = 0.0379$), hervor. Zwischen den unbehandelten und den behandelten Asthmatikern zeigen sich ebenfalls Unterschiede, wenn auch nicht so eminent wie bei den Rhinitikern wie aus der Tab. 10 zu entnehmen ist.

3.2.3 GINA-Score

Die Auswertung des GINA-Scores in der asthmatischen Probandengruppe ergab nur bei einem Probanden ein unkontrolliertes Asthma mit 3 oder mehr Punkten. In der Abb. 15 ist der Vergleich zwischen der Asthma-Gruppe mit und ohne Immuntherapie dargestellt. Im Vergleich der beiden Asthmagruppen mit und ohne Immuntherapie konnte ein signifikanter Unterschied ($p= 0,0294$) festgestellt werden. So zeigte sich in der Gruppe, die sich einer Immuntherapie unterzogen hatten, ein sehr homogenes Bild und weitaus niedrigere Punktezahl im GINA-Score.

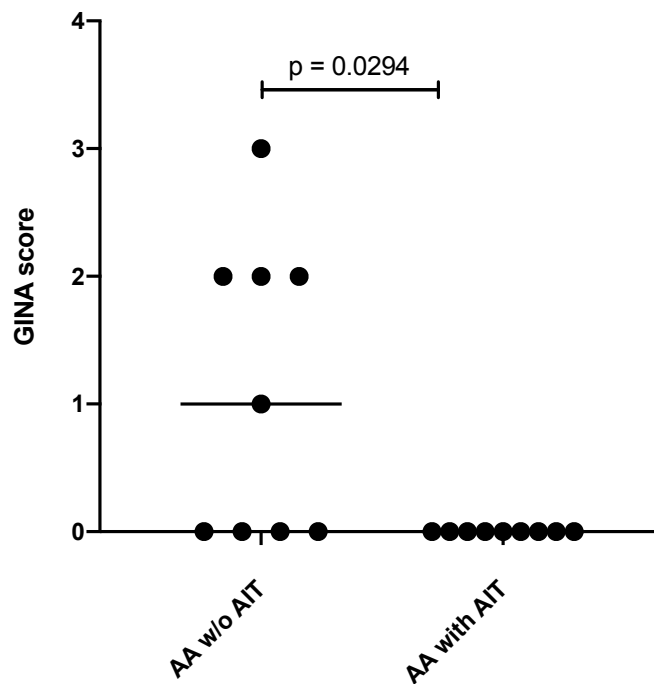


Abbildung 15: GINA-Score.

Charakterisierung der Asthma-Gruppen anhand des GINA-Scores. Es können von 0-4 Punkten je nach Klinik erreicht werden. 3 oder mehr Punkte gelten als unkontrolliertes Asthma. Es ist der Vergleich der beiden Asthmagruppen mit und ohne Immuntherapie dargestellt ($p= 0,0294$). In beiden Gruppen zeigt sich, dass bei allen Probanden ein kontrolliertes Asthma vorlag mit Ausnahme eines einzigen Probanden in der Gruppe ohne Immuntherapie.

3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

3.3.1 Th2-Zellen im Durchflusszytometer

Dass Allergenexposition bei allergischen Patienten eine Th2-getriebene Immunantwort generiert, ist seit langem bekannt (Del Prete et al., 1993). Dieses Erkenntnis bezieht sich jedoch vor allem auf Untersuchungen der peripheren Immunantwort anhand von peripherem Blut. In dieser Arbeit konnten die vorliegenden Erkenntnisse bestätigt werden und mithilfe von Analysen der lokalen Immunantwort mittels Untersuchungen des Sputums erweitert werden. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Sputumzellen und der isolierten PBMCs in Hinblick auf Th2-Zellen wurden die verschiedenen Patientengruppen jeweils während der Graspollen-Saison (Mai bis August) und außerhalb der Graspollen-Saison (Oktober bis Februar) miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Medianen (25, 50=Median, 75) angegeben.

3.3.1.1 Sputum

Die Th2-Level im Sputum zeigten sich während der Graspollen-Saison bei Rhinitis-Patienten und Asthmatikern statistisch signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe und allergischen Patienten mit Immuntherapie. Bei Rhinitikern ohne Immuntherapie liegt der Anteil an Th2-Zellen am höchsten ($8,6\% \pm 1,1$) verglichen mit den Rhinitikern mit Immuntherapie ($2,9\% \pm 1,12$; $p \leq 0,0001$). Bei den allergischen Asthmatikern ohne Immuntherapie ($7,6\% \pm 1,3$) liegt die Th2-Frequenz ebenfalls weit über der von allergischen Asthmatikern mit Immuntherapie ($2,3\% \pm 0,5$; $p \leq 0,01$). Sowohl bei Rhinitikern als auch bei den Asthmatikern zeigten sich also bei Probanden mit durchgeführter Immuntherapie signifikant niedrigere Th2-Spiegel (Abb. 16). Außerhalb der Graspollen-Saison konnte bei den Patienten mit Immuntherapie kein signifikanter Unterschied zu Patienten ohne Immuntherapie aufgezeigt werden. Nur im Vergleich Rhinitiker ($2,5\% \pm 0,6$; $p \leq 0,0001$) und Asthmatischer ($3,2\% \pm 0,5$; $p \leq 0,0001$) ohne Immuntherapie zur gesunden Kontrollgruppe ($0,4\% \pm 0,8$) gab es signifikante Unterschiede (Abb. 16). Vergleicht man die Th2-Level außerhalb und während der Graspollen-Saison findet man in außerhalb der Graspollen-Saison bei unbehandelten Rhinitikern

(2,5%±0,6) und unbehandelten Asthmatikern (3,2%±0,5) signifikant niedrigere Werte als bei den unbehandelten Rhinitikern (8,6%±1,1; $p \leq 0,001$) und Asthmatikern (7,6%±1,3; $p \leq 0,01$) während der Graspollen-Saison (Abb.17).

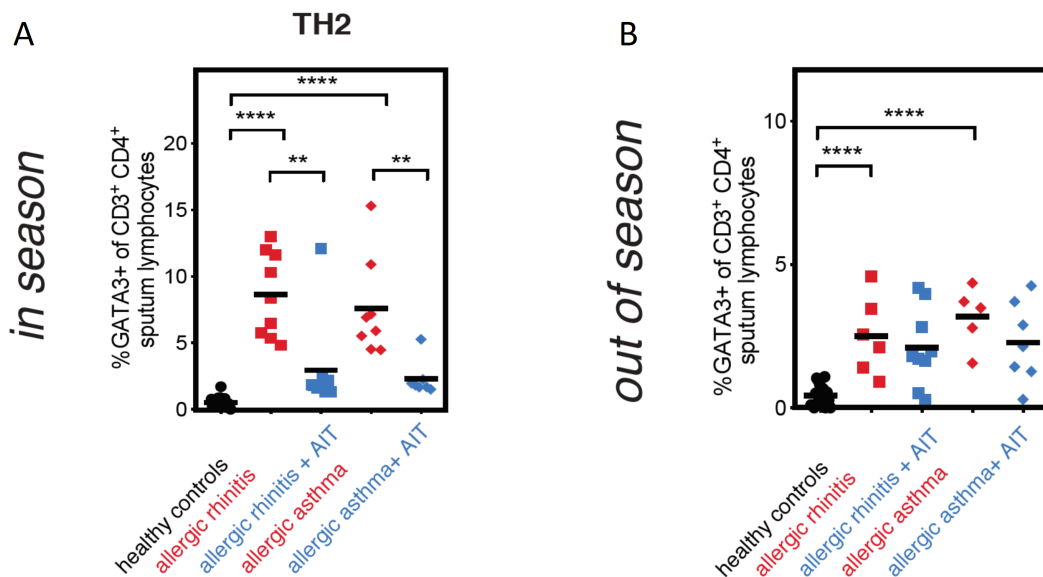


Abbildung 16: Th2-Zellen im Sputum.

Anteil der Th2-Zellen im Sputum bei der Kontrollgruppe, Rhinitikern ohne Immuntherapie, Rhinitikern mit Immuntherapie, Asthmatikern ohne Immuntherapie und Asthmatikern mit Immuntherapie während der Graspollen-Saison (A) und außerhalb der Graspollen-Saison (B). Die Ergebnisse sind in Medianen (25, 50=Median, 75) angegeben. Die Signifikanz ist durch das Symbol „**“ angegeben. Es wurde mit dem Kruskal Wallis Test vorgetestet, um multiples Testen zu vermeiden. Bei positiver Vortestung wurde zur Gruppeneinzeltestung ein beidseitiger Mann -Whitney U Test verwendet.

3.3.1.2 PBMC

Für systemische Th2-Zellen zeigte sich im Vergleich von allergischen unbehandelten Patienten zu allergischen Patienten mit Immuntherapie und der gesunden Kontrollgruppe ein ähnliches Bild wie im Sputum. Während der Graspollen-Saison im Vergleich der unbehandelten Rhinitis- und Asthmapatienten zeigten sich eindeutige signifikante Unterschiede zu den Rhinitikern mit Immuntherapie ($p \leq 0,0001$) und Asthmatikern mit Immuntherapie ($p \leq 0,01$). Während der Graspollen-Saison konnten auch signifikante Unterschiede für Th2-Zellen zwischen Rhinitikern mit Immuntherapie (1,0%±0,2) und behandelten Asthmatikern (2,2%±0,4; $p \leq 0,05$)

nachgewiesen werden. Ferner waren die Th2-Frequenzen bei den behandelten Rhinitikern ($1,0\% \pm 0,2$; $p \leq 0,05$) und den behandelten Asthmatikern ($2,2\% \pm 0,4$; $p \leq 0,0001$) signifikant erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($0,6\% \pm 0,1$) (Abb. 17A). Außerhalb der Graspollen-Saison war der Unterschied zwischen behandelten Rhinitikern ($0,7\% \pm 0,2$; $p \leq 0,05$) und behandelten Asthmatikern ($0,9\% \pm 0,1$; $p \leq 0,0001$) verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($0,3\% \pm 0,04$) statistisch signifikant (Abb. 17), auch wenn die Anteile mit $<1\%$ sehr niedrig waren.

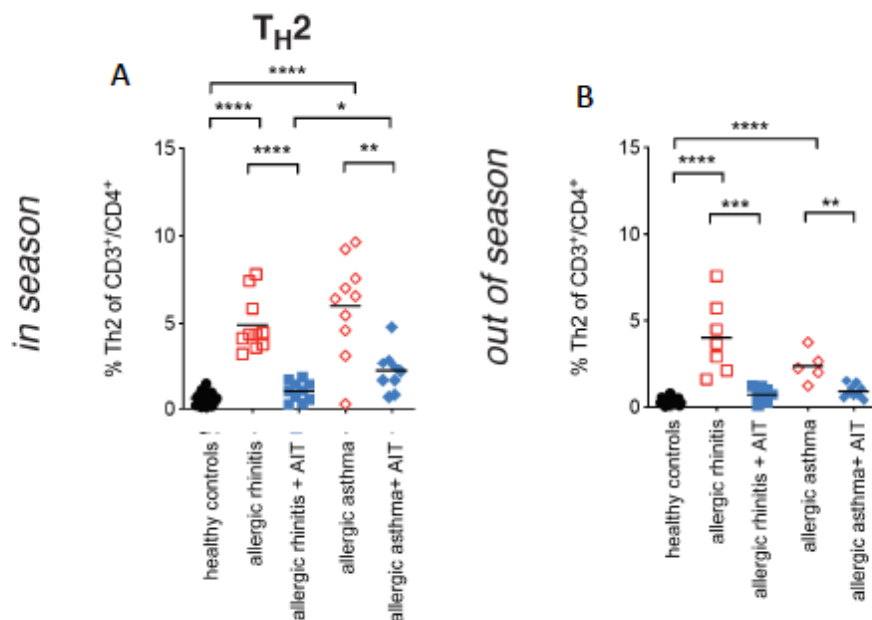


Abbildung 17: Th2-Zellen in PBMC.

Anteil der Th2-Zellen im peripheren Blut bei der Kontrollgruppe, Rhinitikern ohne Immuntherapie, Rhinitikern mit Immuntherapie, Asthmatikern ohne Immuntherapie und Asthmatikern mit Immuntherapie während der Graspollen-Saison (A) und außerhalb der Graspollen-Saison (B). Die Signifikanz ist durch das Symbol „*“ angegeben. Es wurde mit dem Kruskal Wallis Test vorgetestet, um multiples Testing zu vermeiden. Bei positiver Vortestung wurde zur Gruppeneinzeltestung ein beidseitiger Mann-Whitney U Test verwendet.

Vergleicht man die lokale Reaktion auf Allergenexposition mit der peripheren Antwort, fällt auf, dass im Sputum bei unbehandelten Rhinitikern während der Graspollen-Saison ($8,6\% \pm 1,1$) ein höherer Anteil der Th2-Zellen als systemisch bei unbehandelten Rhinitikern ($4,9\% \pm 1,5$) zu vermerken ist.

Nicht nur sind die prozentuellen Anteile im Sputum höher als im peripheren Blut, sondern die Th2-Level unterscheiden sich im Sputum außerhalb und während der Graspollen-Saison auch stärker zwischen Rhinitis-Patienten ohne Immuntherapie (während der Graspollen-Saison $8,6\% \pm 1,1$ / außerhalb der Graspollen-Saison $2,5\% \pm 0,6$) als im Blut, wo sie bei den Rhinitis Patienten ohne Immuntherapie während der Graspollen-Saison von $4,9\% \pm 1,5$ auf $4,0\% \pm 2,0$ außerhalb der Graspollen-Saison sinken.

3.3.2 Th9-Zellen im Durchflusszytometer

Wie Th2-Zellen spielen auch Th9-Zellen, Hauptproduzent von IL-9, eine große Rolle in der Entwicklung von allergischer Atemwegsentzündung (Shimbara et al., 2000). Um den Einfluss von allergenspezifischer Immuntherapie genauer analysieren zu können, wurden die Th9-Spiegel lokal und systemisch bei Rhinitikern und Asthmatikern sowie der Kontrollgruppe gemessen. Bei der Analyse der Th9-Zellen, also IL-9+ CD3+ CD4+ T-Zellen, konnten wir feststellen, dass die Ergebnisse vergleichbar sind mit denen der Th2-Zellen.

3.3.2.1 Sputum

Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigte sich lokal während der Graspollen-Saison sowohl bei den Patienten mit allergischer Rhinitis ohne Immuntherapie ($7,1\% \pm 0,5; p \leq 0,0001$) im Vergleich zu den Rhinitikern mit Immuntherapie ($1,0\% \pm 0,3$) als auch bei Patienten mit allergischem Asthma ohne Immuntherapie ($6,5\% \pm 1,0; p \leq 0,01$) zu den Asthmatikern mit Immuntherapie ($1,7\% \pm 0,8$) ein erhöhter Anteil an Th9-Zellen. Außerhalb der Graspollen-Saison zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten ($1,9\% \pm 0,3$) und behandelten Rhinitikern ($1,03\% \pm 0,21; p \leq 0,05$) und unbehandelten Asthmatikern ($4,02\% \pm 0,65$) und behandelten ($1,0\% \pm 0,2; p \leq 0,05$), was für die Th2-Zellen außerhalb der Graspollen-Saison nicht gezeigt werden konnte. Unbehandelte Asthmatiker wiesen außerhalb der Graspollen-Saison ($4,0\% \pm 0,7; p = 0,017$) höhere Th9-Zellspiegel auf als unbehandelte Rhinitiker ($1,9\% \pm 0,3$).

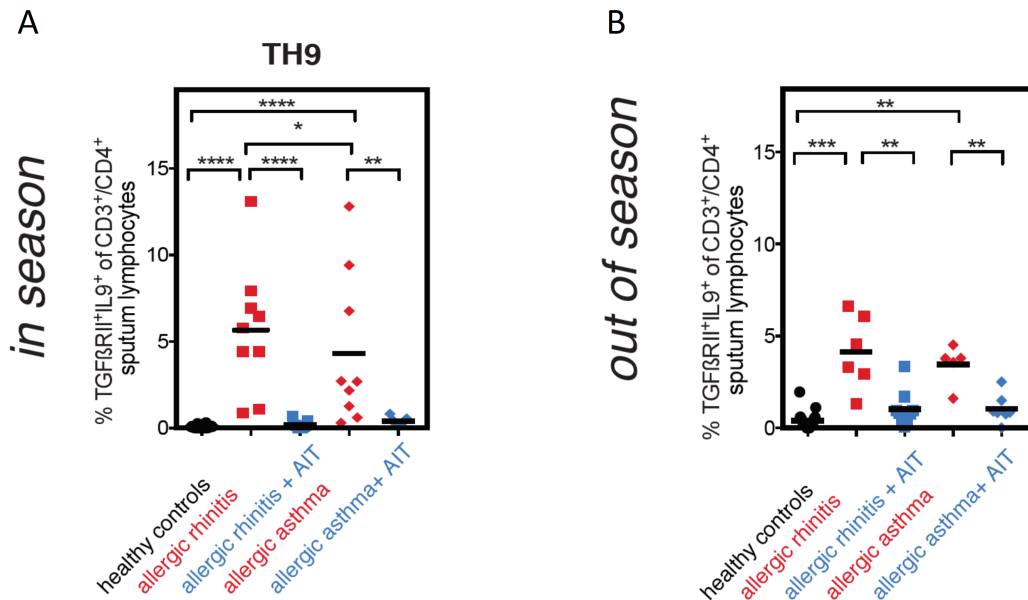


Abbildung 18: Th9-Zellen im Sputum.

Anteil der Th9-Zellen im Sputum bei der Kontrollgruppe, Rhinitikern ohne Immuntherapie, Rhinitikern mit Immuntherapie, Asthmatikern ohne Immuntherapie und Asthmatikern mit Immuntherapie während der Graspollen-Saison (A) und außerhalb der Graspollen-Saison (B). Die Signifikanz ist durch das Symbol „*“ angegeben. Es wurde mit dem Kruskal Wallis Test vorgetestet, um multiples Testing zu vermeiden. Bei positiver Vortestung wurde zur Gruppeneinzeltastung ein beidseitiger Mann -Whitney U Test verwendet.

3.3.2.2 PBMC

Systemisch zeigten sich signifikant erhöhte Th9 Frequenzen bei allergischen und auch asthmatischen Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen unabhängig von der Pollenflugsaison. Patienten mit Immuntherapie wiesen generell, ebenfalls unabhängig der Saison, niedrigere Th9 Frequenzen vor. So gingen die Th9 Frequenzen während der Graspollen-Saison bei unbehandelten Rhinitikern ($4,9\% \pm 0,5$) und unbehandelten Asthmatikern ($3,8\% \pm 0,6$) auf weit unter 1% bei behandelten Rhinitikern ($0,6\% \pm 0,3$; $p \leq 0,0001$) oder behandelten Asthmatikern ($0,6\% \pm 0,1$; $p \leq 0,01$) (Abb. 19). Außerhalb der Graspollen-Saison zeigte sich ebenfalls eine signifikante Differenz zwischen behandelter ($0,48\% \pm 0,14$) und unbehandelter Rhinitis ($1,9\% \pm 0,3$; $p \leq 0,001$) und behandeltem ($0,7\% \pm 0,1$) und unbehandeltem Asthma ($2,4\% \pm 0,8$; $p \leq 0,05$) (siehe Abb. 19).

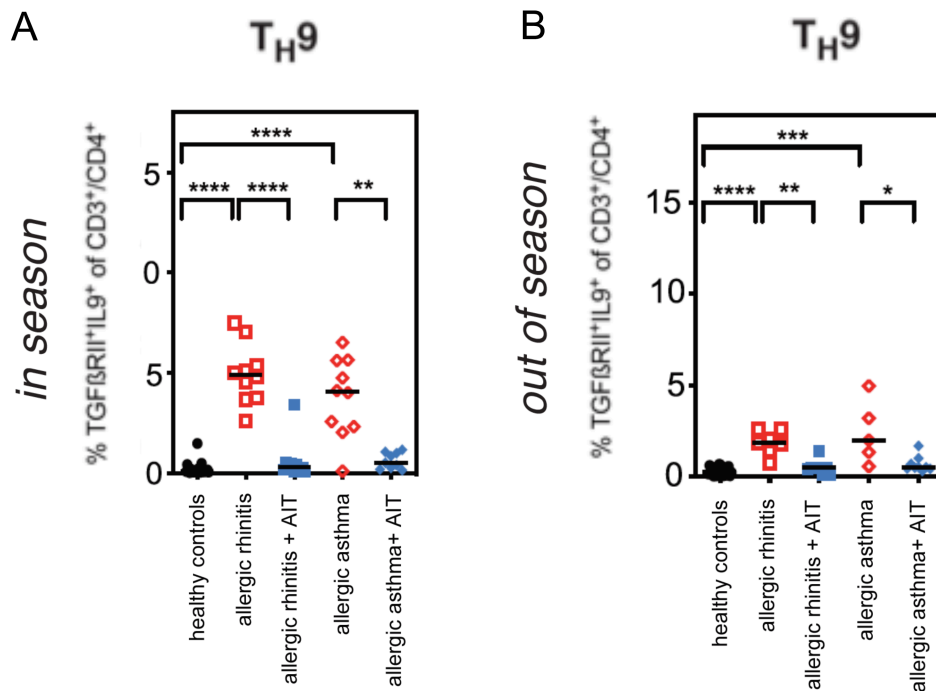


Abbildung 19: Th9-Zellen in PBMC.

Anteil der Th9-Zellen im PBMC bei der Kontrollgruppe, Rhinitikern ohne Immuntherapie, Rhinitikern mit Immuntherapie, Asthmatikern ohne Immuntherapie und Asthmatikern mit Immuntherapie während der Graspollen-Saison (A) und außerhalb der Graspollen-Saison (B). Die Signifikanz ist durch das Symbol „*“ angegeben. Es wurde mit dem Kruskal Wallis Test vorgetestet, um multiples Testing zu vermeiden. Bei positiver Vortestung wurde zur Gruppeneinzeltastung ein beidseitiger Mann -Whitney U Test verwendet.

Parallel zu den Th2-Analysen war ein saisonaler Unterschied zwischen der unbehandelten Rhinitikergruppe während der Graspollen-Saison ($4,9\% \pm 0,5$) und außerhalb der Graspollen-Saison ($1,9\% \pm 0,3; p \leq 0,0001$) und zwischen den unbehandelten Asthmatikern während der Graspollen-Saison ($3,8\% \pm 0,6$) und außerhalb der Graspollen-Saison ($2,4\% \pm 0,8; p \leq 0,01$) zu finden. Wie bei den Th2-Zellen zeigt sich, dass die Antwort lokal stärker ausfällt als peripher und, dass lokal der Unterschied zwischen Allergenexposition und Ruhephase größer ist. Im Blut unterscheiden sich die Th2- und Th9-Zellspiegel außerhalb und während der Graspollen-Saison nicht so stark wie lokal. Diese Ergebnisse zeigen, dass Th9-Zellen eine wichtige Rolle bei durch Allergenexposition

induzierten entzündlichen Prozessen spielen, die durch Immuntherapie auf systemischer und lokaler Ebene zellulär gegenreguliert werden können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Th2- und Th9-Level bei Allergikern ohne Immuntherapie erhöht sind im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten, aber vor allem auch im Vergleich zu Patienten mit durchlaufener Immuntherapie. Die höchsten Anteile der Th2- und Th9-Zellen findet man lokal während der Allergiephase mit einem Anteil von bis zu $8,6\% \pm 1,1$ für Th2 und $7,1\% \pm 0,5$ für Th9 bei allergischen Rhinitikern. Die systemische Antwort ist nicht so stark mit $4,9\% \pm 1,5$ für Th2 und $4,9\% \pm 0,5$ für Th9 bei Rhinitikern während der Graspollen-Saison.

Wir konnten einen signifikanten Unterschied außerhalb und während der Graspollen-Saison aufzeigen, was darauf hinweist, dass die Th2- und Th9-Spiegel an die Allergenexposition gebunden sind. Auch konnte ein Unterschied auf zellulärer Ebene zwischen Allergikern mit und ohne Immuntherapie aufgezeigt werden.

Es zeigte sich ein signifikanter und eindeutiger Unterschied zwischen lokal und systemischer Antwort. Lokal konnten wir während der Graspollen-Saison die höchsten Anteile an Th2- und Th9-Zellen finden und eine größere Differenz außerhalb und während der Graspollen-Saison als bei der Analyse der peripheren Zellen. Systemisch waren niedrigere Anteile an Th2- und Th9-Zellen vorzufinden und auch eine geringere Differenz außerhalb und während der Graspollen-Saison.

3.3.3 Treg Zellen im Durchflusszytometer

Im Rahmen der allergenspezifischen Immuntherapie geht man davon aus, dass *de novo* induzierte allergenspezifische regulatorische T-Zellen die Suppression von proallergischen Th2- und Th9-Zellen mitverantworten (U. M. Zissler et al., 2018).

3.3.3.1 Sputum

Diese These bestätigend konnten in den Sputumproben der Probanden mit allergischer Rhinitis ($1,7\% \pm 0,3$) und allergischem Asthma ($1,7\% \pm 0,2$) ohne Immuntherapie geringere Mengen an FoxP3 positiven Tregs gemessen

werden im Vergleich zu den behandelten Rhinitikern (5.4 ± 0.5 ; $p \leq 0.0001$) und Asthmatikern (5.2 ± 0.5 ; $p \leq 0.001$). Zusätzlich zeigten sich verminderte FoxP3 positive Treg-Spiegel in lokalen Sputumproben unbehandelter Rhinitispatienten ($1,5\% \pm 0,2$) und unbehandelter Asthmapatienten ($1,4\% \pm 0,1$) außerhalb der Graspollen-Saison im Vergleich zu behandelten Rhinitispatienten ($5,4 \pm 0,5$; $p \leq 0,001$) und behandelten Asthmapatienten ($5,3 \pm 0,3$; $p \leq 0,01$). Hervorzuheben ist, dass Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Patientengruppen auszumachen waren, aber im Vergleich der Gruppen mit derselben Behandlung (AR+AIT vs AA+AIT oder AR-AIT vs AA-AIT) keine Unterschiede aufgezeigt werden konnten (siehe Abb. 20).

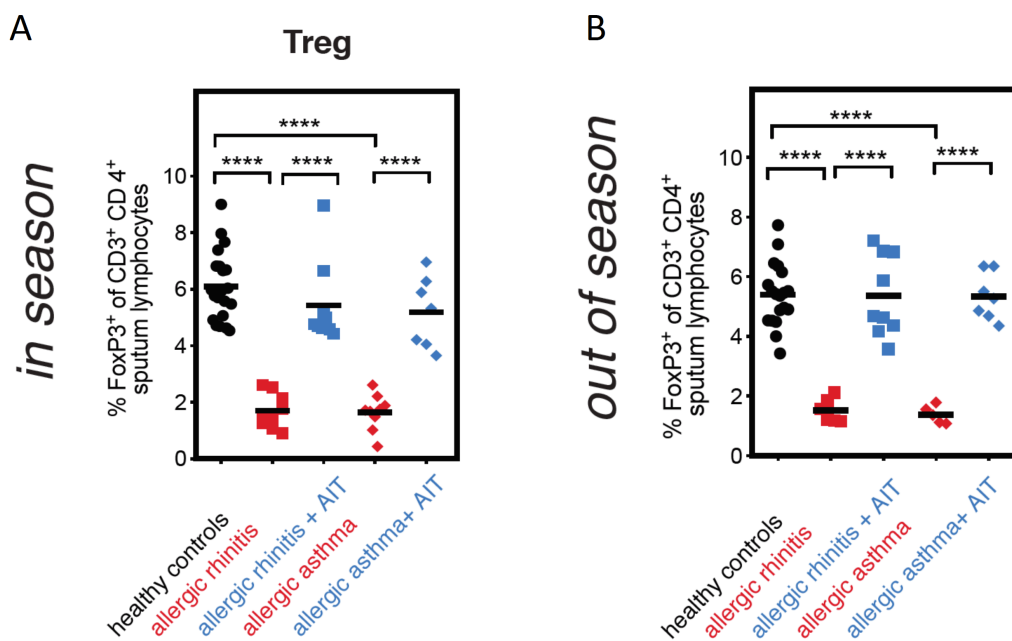


Abbildung 20: Treg Zellen in Sputum.

Anteil der FoxP3 positiven Treg Zellen im Sputum bei der Kontrollgruppe, Rhinitikern ohne Immuntherapie, Rhinitikern mit Immuntherapie, Asthmatikern ohne Immuntherapie und Asthmatikern mit Immuntherapie während der Graspollen-Saison (A) und außerhalb der Graspollen-Saison (B). Die Signifikanz ist durch das Symbol „****“ angegeben. Es wurde mit dem Kruskal Wallis Test vorgetestet, um multiples Testen zu vermeiden. Bei positiver Vortestung wurde zur Gruppeneinzelttestung ein beidseitiger Mann -Whitney U Test verwendet.

3.3.3.2 PBMC

Die Analyse der regulatorischen T-Zellen im Blut der Probanden zeigte vergleichbare Befunde wie die Analyse des Sputums, wenn auch nicht so ausgeprägt (vergleiche Abb. 20 und 21). Es sticht auch hier ein Unterschied zwischen Rhinitikern mit ($3,8 \pm 0,4$) und ohne Immuntherapie ($1,7 \pm 0,3$) sowie Asthma-Patienten mit ($3,9 \pm 0,3$) und ohne Immuntherapie ($1,9 \pm 0,4$) hervor. Bei erfolgter Immuntherapie AR+AIT ($3,8 \pm 0,4$) und AA+AIT ($3,9 \pm 0,3$) zeigen sich die Werte auf hohem Niveau vergleichbar mit der Kontrollgruppe ($4,2 \pm 0,7$). Ohne Immuntherapie zeigten sich bei den Probanden sowohl bei allergischer Rhinitis ($1,7 \pm 0,3$) als auch bei Asthma ($1,9 \pm 0,4$) ähnlich niedrigere Werte.

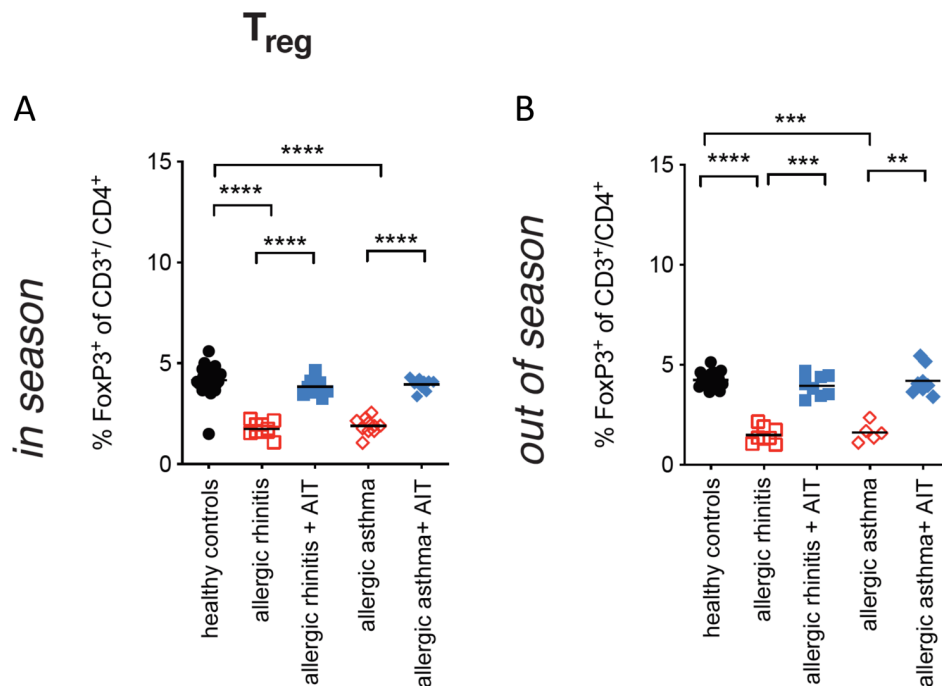


Abbildung 21: Treg Zellen in PBMC.

Anteil der FoxP3 positiven Treg Zellen im peripheren Blut bei der Kontrollgruppe, Rhinitikern ohne Immuntherapie, Rhinitikern mit Immuntherapie, Asthmatikern ohne Immuntherapie und Asthmatikern mit Immuntherapie während der Graspollen-Saison und außerhalb der Graspollen-Saison. Die Signifikanz ist durch das Symbol „*“ angegeben. Es wurde mit dem Kruskal Wallis Test vorgetestet, um multiples Testing zu vermeiden. Bei positiver Vortestung wurde zur Gruppeneinzeltestung ein beidseitiger Mann-Whitney U Test verwendet.

3.4 Korrelationen der durchflusszytometrischen und klinischen Daten

Um die Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse in klinischen Zusammenhang zu bringen, wurden diese im Folgenden auf Korrelationen untersucht. Dabei wurden Korrelationen zwischen den einzelnen T Zellen (Th2, Th9 und Treg) mit dem IgE-Spiegel berechnet. IgE gilt als entscheidender Spieler in der allergischen Immunantwort und wird auch in der klinischen Diagnostik verwendet (Platts-Mills, 2001). Da das Vorhandensein von IgE oder einem positiven Pricktest jedoch noch nicht zwingend allergische Symptome mit sich bringt, erfolgte in einem weiteren Schritt die Analyse von Korrelationen zwischen den Th2, Th9 und Treg Zellen und dem anamnestisch erhobenen RQLQ-Score (Linda Cox et al., 2008). Der RQLQ-Score erfragt klinische Symptome der Probanden und deren Einschränkungen im Alltag und Freizeit durch dieselben.

3.4.1 Korrelation IgE und Th2

Für Th2-Zellen konnten wir während der Graspollen-Saison einen signifikanten Zusammenhang von $r=0,369$ ($p<0,002$) mit dem IgE-Spiegel im Blut nachweisen (siehe Abb. 22 B).

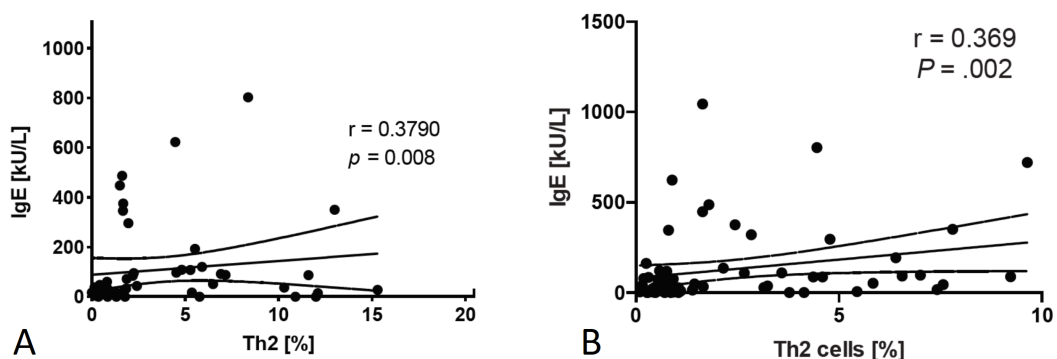


Abbildung 22: Korrelation IgE und Th2-Zellen.

Korrelation zwischen Anteil an Th2-Zellen und dem IgE-Spiegel im Sputum (A) und im peripheren Blut (B) während der Graspollen-Saison. Angegeben sind der Korrelationswert r und der p -Wert. Es erfolgte eine bivariate Rangkorrelationsanalyse nach Spearman.

Im Sputum war die Korrelation ebenfalls signifikant und mit $r = 0,379$ ($p < 0,01$) etwas stärker als peripher mit $r = 0,369$ (siehe Abb. 22 A). Lokal konnte somit ein stärkerer Zusammenhang festgestellt werden als peripher.

3.4.2 Korrelation IgE und Th9

Korrelationen mit dem IgE und den Th9-Zellen während der Graspollen-Saison wurden ebenfalls untersucht und es ergaben sich auch hier signifikante positive Zusammenhänge im peripheren Blut (Abb. 23 B) mit $r = 0,323$ ($p < 0,008$) und Sputum (Abb. 23 A) mit $r = 0,321$ ($p < 0,023$). Zwischen lokalen und systemischen Ergebnissen zeigen sich bei den Th9-Zellen kaum Unterschiede.

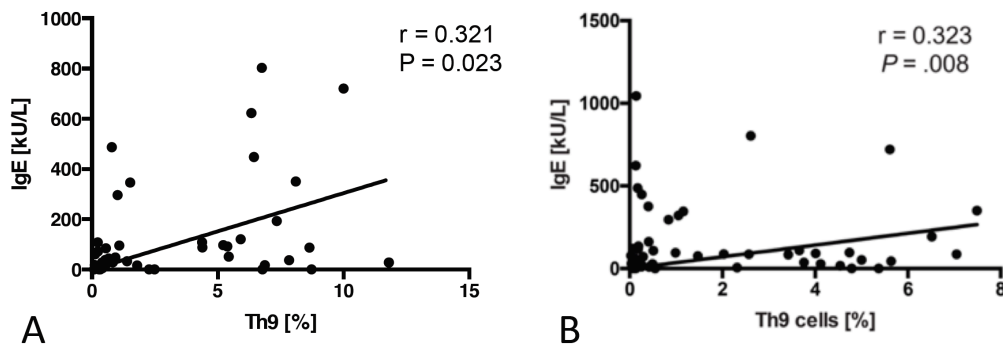


Abbildung 23: Korrelation IgE und Th9-Zellen.

Korrelation zwischen Anteil an Th9-Zellen und dem IgE-Spiegel im Sputum (A) und im peripheren Blut (B) während der Graspollen-Saison. Angegeben sind der Korrelationswert r und der p -Wert. Es erfolgte eine bivariate Rangkorrelationsanalyse nach Spearman.

3.4.3 Korrelation RQLQ und Th2

Auch mit dem RQLQ (Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire) konnte eine Korrelation mit Th2-Spiegeln nachgewiesen werden (Abb. 24 A).

Zur Erinnerung soll erwähnt werden, dass ein hoher RQLQ Score für eine stärkere Beeinträchtigung des Patienten im Alltag durch seine allergischen Symptome steht. Th2-Zellen im Blut zeigten einen signifikanten Zusammenhang von $r = 0,414$ ($p < 0,0005$) mit dem RQLQ Score (Abb. 24 B).

Für Th2-Zellen im Sputum konnte ein weitaus stärkerer Zusammenhang von $r=0,702$ ($p<0,0001$) mit dem RQLQ Score gezeigt werden.

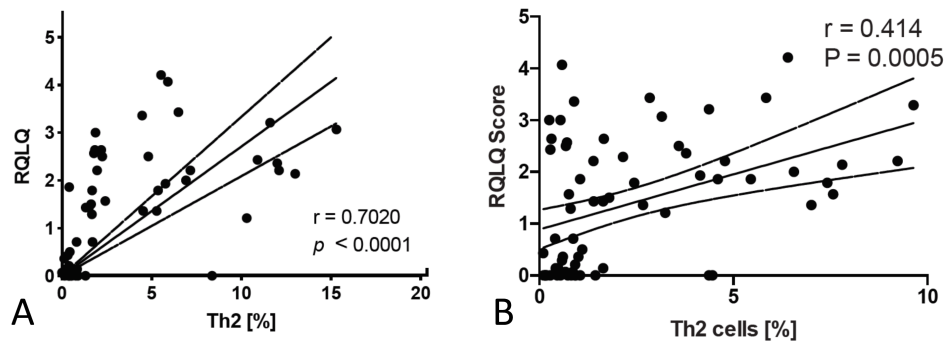


Abbildung 24: Korrelation Th2-Zellen und RQLQ.

Korrelation zwischen Anteil an Th2-Zellen und dem RQLQ-Score im Sputum (A) und im peripheren Blut (B) während der Graspollen-Saison. Angegeben sind der Korrelationswert r - und der p -Wert. Es erfolgte eine bivariate Rangkorrelationsanalyse nach Spearman.

3.4.4 Korrelation RQLQ und Th9

Auch für Th9-Zellen wurden Korrelationen mit dem RQLQ-Score erhoben, um einen Zusammenhang zwischen Klinik und Veränderungen auf zellulärer Ebene zu analysieren.

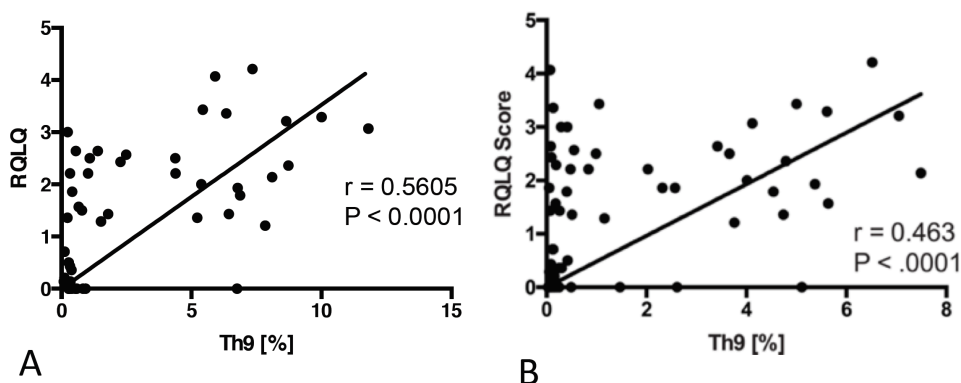


Abbildung 25: Korrelation Th9-Zellen und RQLQ.

Korrelation zwischen Anteil an Th9-Zellen und dem RQLQ-Score im Sputum (A) und im peripheren Blut (B) während der Graspollen-Saison. Angegeben sind der Korrelationswert r und der p -Wert. Es erfolgte eine bivariate Rangkorrelationsanalyse nach Spearman.

Für Th9-Zellen ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie für die Th2-Zellen. Sowohl im Blut (Abb. 25 B) als auch im Sputum (Abb. 25 A) konnten wir signifikante Korrelationen mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$ in beiden Fällen nachweisen. Während im Blut die Korrelation mit $r = 0,463$ moderat ist, liegt der r-Wert im Sputum höher bei $0,5605$.

3.4.5 Korrelation RQLQ-Scores und Th2, Th9 und Treg Zellen

Tab. 10 zeigt die Korrelation zwischen dem RQLQ-Score aufgeteilt in funktionelle Untereinheiten mit den jeweilig untersuchten Th-Zell Untergruppen Th2, Th9 und Treg. Es zeigt sich, dass die Korrelation von Th2- und Th9-Zellen zum RQLQ Score bei bestimmten Punkten wie beispielsweise nasalen Symptomen besonders hoch ist mit $r = 0,745$ bei Th2-Zellen und mit $r = 0,613$ bei Th9-Zellen.

Es zeigt sich auch eine sehr starke Korrelation zwischen Th2-Zellen und der Einschränkung in Freizeitaktivitäten mit $r = 0,637$ und praktischen Problemen wie berufliche oder alltägliche Einschränkungen bei Tätigkeiten in Haus oder Garten mit $r = 0,720$.

Wie zu erwarten, zeigt sich zwischen RQLQ-Score und Treg Zellen eine negative Korrelation. Das weist darauf hin, dass höhere Treg Zellspiegel zu einer geringeren klinischen Einschränkung durch allergische Symptome führen. Auch hier zeigten sich die stärkste Korrelation bei nasalen ($r = -0,572$) und Augensymptomen ($r = -0,562$). Insgesamt waren die Korrelationen bei den Treg Zellen leichtgradig geringer als bei den Th2- oder Th9-Zellen mit dem RQLQ-Score.

3.4.6 Korrelation Th2 mit Th9

Zudem wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden Th Zell-Untergruppen Th2 und Th9 untersucht. Wie nach den obigen Ergebnissen zu erwarten, konnte sowohl im Blut als auch im Sputum eine signifikante Korrelation zwischen Th2- und Th9-Zellen gezeigt werden mit $r = 0,7042$ ($p < 0,0001$) im Sputum (Abb. 26 A) und $r = 0,7358$ ($p < 0,0001$) im Blut (Abb. 26 B).

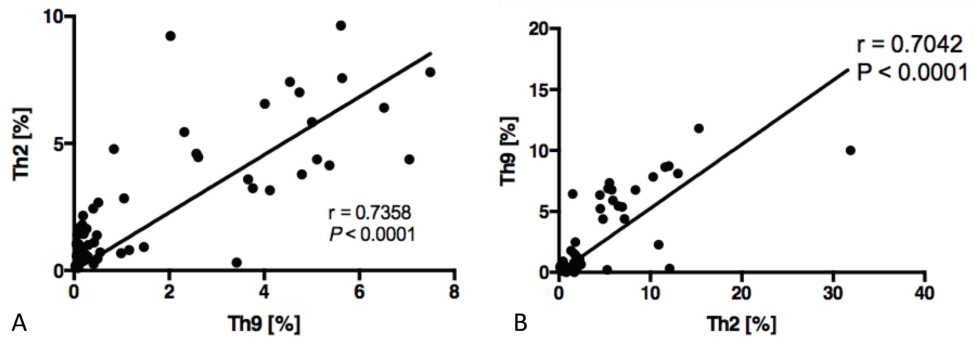


Abbildung 26: Korrelation Th9- und Th2-Zellen.

Korrelation zwischen Anteil an Th9-Zellen und Anteil an Th2-Zellen im Sputum (A) und im peripheren Blut (B) während der Graspollen-Saison. Angegeben sind der Korrelationswert r - und der p -Wert. Es erfolgte eine bivariate Rangkorrelationsanalyse nach Spearman.

3.5 Ergebnisse der Proteinanalysen

Die bei der Sputumverarbeitung gewonnenen Sputumüberstände wurden verwendet, um Proteinanalysen durchzuführen und zu vergleichen, ob und wie diese Ergebnisse mit denen der Durchflusszytometrie des Sputums übereinstimmen (eine Übersicht siehe in Tab. 11).

3.5.1 Th2 assoziierte Zytokine

In unserem Interesse standen für Th2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die in der Literatur eindeutig den Th2-Zellen zugeordnet werden konnten und eine entscheidende Rolle in der allergischen Immunreaktion spielen (Deo, Mistry, Kakade, & Niphadkar, 2010).

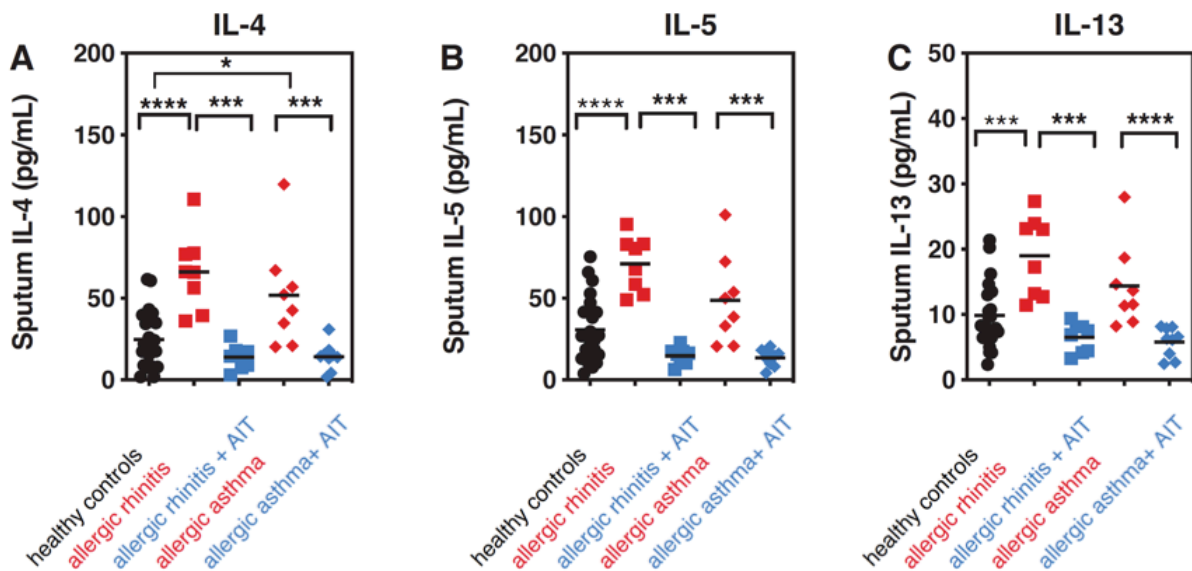


Abbildung 27: Vergleich der Th2 assoziierten Zytokine während der Graspollensaison.

Angezeigt sind die Th2 assoziierten Zytokine IL-4 (A), IL-5 (B) und IL-13 (C) exprimiert im Sputumüberstand zwischen den jeweiligen Probandengruppen mit und ohne Immuntherapie während der Graspollen-Saison. Die Menge der Th2 assoziierten Zytokine IL-2 (A), IFN- γ (B) und IL-10 (C) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ $p < 0,05$, „**“ $p < 0,01$, „***“ $p < 0,001$ und „****“ $p > 0,0001$.

Wie erwartet fanden wir während der Graspollen-Saison bei Allergikern ohne Immuntherapie erhöhte IL-4 (Bild A), IL5 (Bild B) und auch IL-13 (Bild C) Spiegel, während diese bei der Kontrollgruppe und vor allem bei Patienten mit Immuntherapie bedeutend niedriger waren. Bei Patienten mit allergischer Rhinitis ohne Immuntherapie konnte man eine signifikante Erhöhung der Th2 assoziierten Zytokine finden (IL-4: $66,1\text{pg/mL} \pm 8,4; p < 0,001$; IL-5: $71,2\text{pg/mL} \pm 5,9; p < 0,001$; IL-13: $19,0\text{pg/mL} \pm 2,2; p < 0,001$) im Vergleich zu Rhinitikern mit Immuntherapie (IL-4: $14,0\text{pg/mL} \pm 2,6$; IL-5: $14,8\text{pg/mL} \pm 1,8$; IL-13: $6,5\text{pg/mL} \pm 0,8$). Ein ähnliches Bild ergibt sich im Vergleich allergischer Asthmatiker ohne Immuntherapie (IL-4: $51,8\text{pg/mL} \pm 11,3; p < 0,001$; IL-5: $48,8\text{pg/mL} \pm 8,7; p < 0,001$; IL-13: $14,4\text{pg/mL} \pm 2,2; p < 0,0001$) und Asthmapatienten mit Immuntherapie (IL-4: $14,2\text{pg/mL} \pm 2,8$; IL-5: $13,6\text{pg/mL} \pm 1,7$; IL-13: $5,8\text{pg/mL} \pm 0,8$) (siehe Abb. 27).

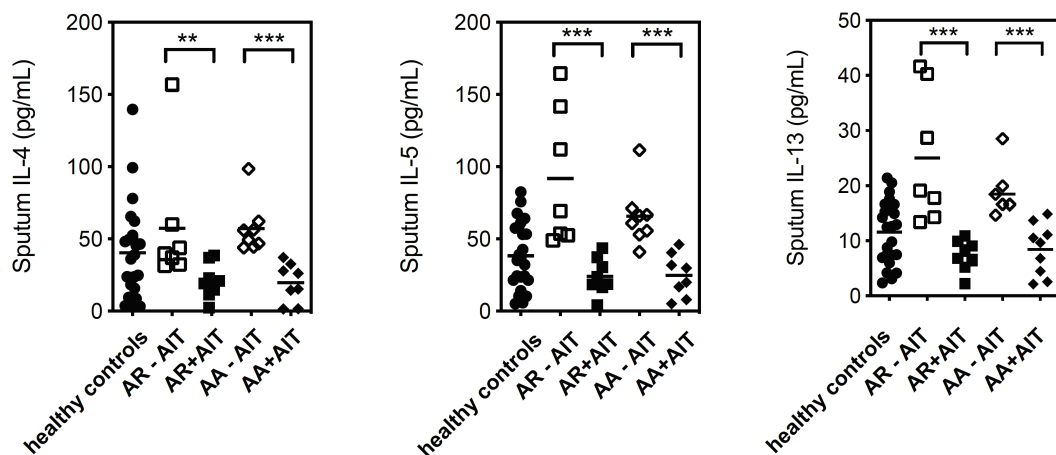


Abbildung 28: Vergleich der Th2 assoziierten Zytokine außerhalb der Graspollensaison.

Verglichen werden die Th2 assoziierten Zytokine IL-4 (A), IL-5 (B) und IL-13 (C) exprimiert im Sputumüberstand zwischen den jeweiligen Probandengruppen mit und ohne Immuntherapie außerhalb der Graspollen-Saison.. Die Menge der Th2 assoziierten Zytokine IL-2 (A), IFN- γ (B) und IL-10 (C) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ $p < 0,05$, „**“ $p < 0,01$, „***“ $p < 0,001$ und „****“ $p > 0,0001$.

Außerhalb der Graspollen-Saison waren die Werte vergleichbar mit denen während der Graspollen-Saison, wenn auch grundsätzlich etwas niedriger. So zeigten sich bei Patienten mit erfolgter Immuntherapie geringere Zytokinlevel sowohl bei Patienten mit allergischer Rhinitis (AR+AIT IL-4: 20,9pg/mL±12,2; IL-5: 24,1pg/mL±12,6; IL-13: 7,4pg/mL±2,8) als auch mit allergischem Asthma (AA+AIT IL-4: 19,5pg/mL±13,6; IL-5: 24,7pg/mL±14,8; IL-13: 8,4pg/mL±4,6). Bei den Probanden ohne Immuntherapie waren die Zytokinspiegel deutlich höher AR-AIT IL-4: 57,2pg/mL±44,9; IL-5: 91,7pg/mL±47,5; IL-13: 25,0pg/mL±11,9 und AA-AIT IL-4: 57,1pg/mL±17,9; IL-5: 65,6pg/mL±20,8; IL-13: 18,5pg/mL±4,3) (siehe Abb. 28).

3.5.2 Th9 assoziierte Zytokine

Da die Differenzierung von Th9-Zellen maßgeblich von TGF β abhängt (Schmitt, Klein, & Bopp, 2014) und IL-9 als Hauptprodukt der Th9-Zellen gilt (Jones et al., 2012), wurden in Hinblick auf Th9-Zellen die Sputumüberstände auf diese beiden Zytokine untersucht.

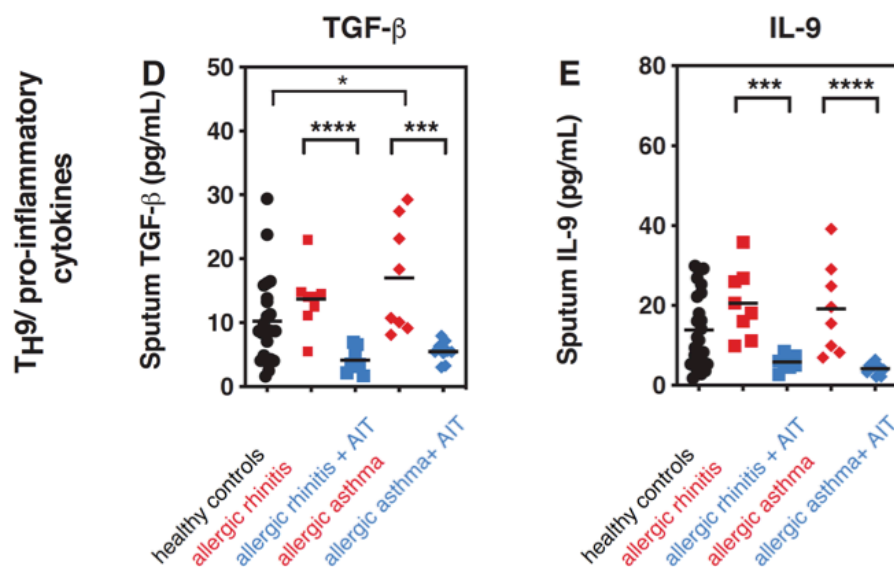


Abbildung 29: Vergleich der Th9 assoziierten Zytokine während der Graspollensaison.

Verglichen werden Th9 assoziierten Zytokine TGF β und IL-9 exprimiert im Sputumüberstand zwischen den jeweiligen Probandengruppen mit und ohne Immuntherapie während der Graspollen-Saison. Die Menge der Th9 assoziierten Zytokine TGF β (D) und IL-9 (E) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das

Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ $p < 0,05$, „***“ $p < 0,01$, „****“ $p < 0,001$ und „*****“ $p > 0,0001$.

Bei den Zytokinen, die den Th9-Zellen zugeschrieben werden, zeigten sich TGF β (Bild D) und IL-9 (Bild E) entsprechend erhöht bei allergischen Rhinitikern ohne Immuntherapie (TGF- β : 13,7pg/mL \pm 1,4, $p < 0,001$; IL-9: 20,6pg/mL \pm 3,1; $p < 0,001$), während sie bei Rhinitikern mit Immuntherapie (TGF- β : 4,1pg/mL \pm 0,7; IL-9: 5,8pg/mL \pm 0,6) in weitaus geringerem Maße exprimiert wurden.

Bei Patienten mit allergischem Asthma ohne Immuntherapie (TGF- β : 17,0pg/mL \pm 3,1; $p < 0,0001$; IL-9: 19,2pg/mL \pm 4,0, $p < 0,0001$) zeigten sich ebenfalls erhöhte Spiegel an exprimierten Zytokinen im Vergleich zu den Asthmatikern mit Immuntherapie (TGF- β : 5,5pg/mL \pm 0,5; IL-9: 4,2pg/mL \pm 0,5) (siehe Abb. 29).

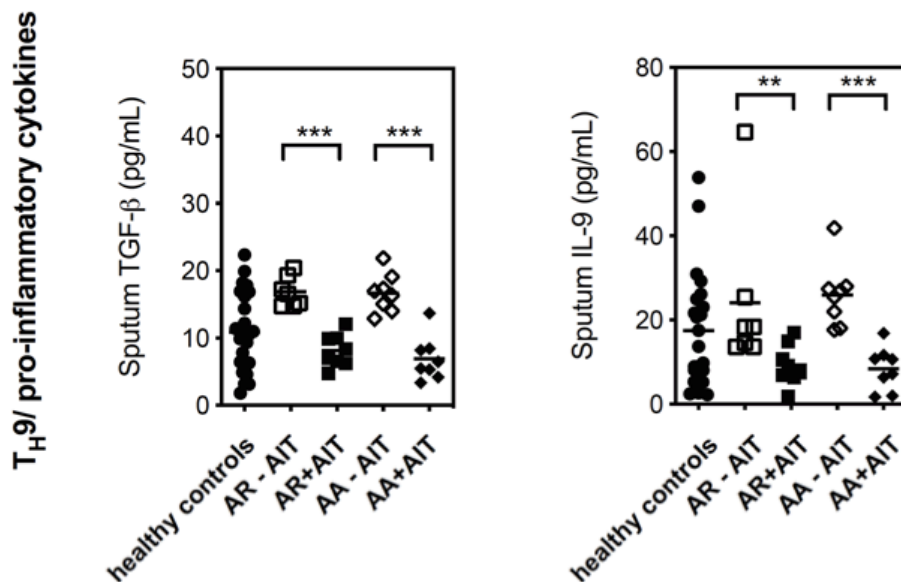


Abbildung 30: Vergleich der Th2 assoziierten Zytokine außerhalb der Graspollensaison.

Verglichen werden die Th9-assoziierten Zytokine TGF β und IL-9 exprimiert im Sputumüberstand zwischen den jeweiligen Probandengruppen mit und ohne Immuntherapie außerhalb der Graspollen-Saison. Die Menge der Th9 assoziierten Zytokine TGF β (D) und IL-9 (E) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ $p < 0,05$, „***“ $p < 0,01$, „****“ $p < 0,001$ und „*****“ $p > 0,0001$.

Außerhalb der Graspollen-Saison zeigten sich etwas niedrigere Werte, aber immer noch im Einklang mit den Ergebnissen der Graspollen-Saison. Auch hier zeigten sich für Probanden mit Immuntherapie niedrigere Werte (AR+AIT TGF- β : 8,1pg/mL \pm 0,8; IL-9: 9,3pg/mL \pm 1,7; AA+AIT TGF- β : 6,9pg/mL \pm 3,3; IL-9: 8,4pg/mL \pm 5,1) als bei Probanden ohne erfolgter Therapie (AR-AIT TGF- β : 16,9pg/mL \pm 2,2; IL-9: 24,1pg/mL \pm 18,4; AA-AIT TGF- β : 16,7pg/mL \pm 2,9; IL-9: 25,9pg/mL \pm 7,6) (siehe Abb. 30).

Bisherige Erkenntnisse zum proinflammatorischen Zytokin IL-6 ergaben, dass Asthmapatienten erhöhte Spiegel vorweisen, auch wenn dessen genaue Rolle in allergischen Erkrankungen noch unklar ist (Neveu et al., 2010). Interessanterweise zeigten die Analysen dieser Arbeit bei der Expression des pleiotropen IL-6 (Abb. 31) in den Sputumüberständen keine signifikanten Unterschiede bei Asthmatikern und Rhinitikern ohne Immuntherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

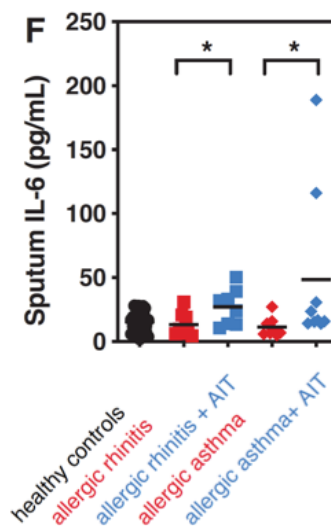


Abbildung 31: IL-6 während der Graspollensaison.

Vergleich der Expression des Zytokins IL-6 im Sputumüberstand zwischen den jeweiligen Probandengruppen mit und ohne Immuntherapie während der Graspollen-Saison. Die Menge des pleiotropen Zytokins IL-6 (F) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ $p < 0,05$, „**“ $p < 0,01$, „***“ $p < 0,001$ und „****“ $p > 0,0001$.

In diesem Fall waren die Spiegel signifikant bei den Patienten mit Rhinitis (27,1pg/mL±5,0) oder Asthma (48,4pg/mL±20,6) mit Immuntherapie erhöht, während Rhinitiker (15,5pg/mL±3,3,p<0,05) und Asthmatiker (11,4pg/mL±2,7,p<0,05) ohne Immuntherapie signifikant niedrigere Spiegel vorwiesen. Es zeigte sich hier jedoch ein geringerer Unterschied zwischen den einzelnen Probandengruppen im Vergleich zu den Zytokinen TGFβ und IL-9 (siehe Abb. 31).

Außerhalb der Graspollen-Saison zeigten sich vergleichbare Befunde zu denen der Graspollen-Saison. Allerdings war nur der Unterschied zwischen allergischen Rhinitikern ohne und mit Immuntherapie signifikant (p<0,001). Sowohl zwischen Asthmapatienten ohne (14,7pg/mL±2,5) und mit Immuntherapie (36,7pg/mL±8,9) als auch zwischen der Kontrollgruppe (18,6pg/mL±3,4) und den asthmatischen Probanden konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden (siehe Abb. 32).

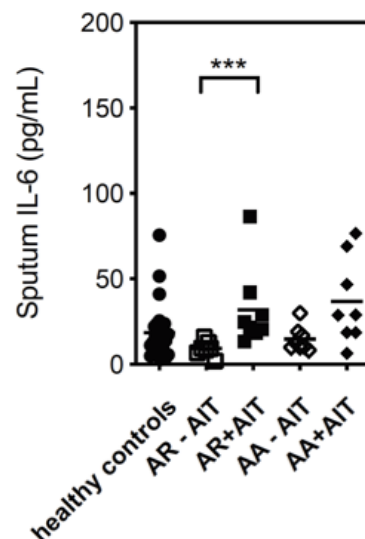


Abbildung 32: IL-6 außerhalb der Graspollensaison.

Vergleich der Expression des Zytokins IL-6 im Sputumüberstand zwischen den jeweiligen Probandengruppen mit und ohne Immuntherapie außerhalb der Graspollen-Saison. Die Menge des pleiotropen Zytokins IL-6 (F) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ p<0,05, „**“ p<0,01, „***“ p<0,001 und „****“ p>0,0001.

3.5.3 Th1 und Treg assoziierte Zytokine

Als Ergänzung zur Messung der proinflammatorischen Zytokine sollten auch antiinflammatorische Zytokine untersucht werden wie Th1-assoziierte Zytokine IL-2 (Abb. 33G) und IFN γ (Abb. 33H) und das Treg-assoziierte Zytokin IL-10 (Abb. 33I). Wie man in den Abb. 33 und 34 sehen kann, konnte man bei den anti-inflammatorischen Zytokinen gegensätzliche Ergebnisse im Vergleich mit den proinflammatorischen Zytokinen finden. So waren während der Graspollen-Saison die Spiegel von IL-10 bei unbehandelten Rhinitispatienten ($3,7\text{pg/mL}\pm 0,6$) im Vergleich zu den behandelten Rhinitispatienten ($7,4\text{pg/mL}\pm 1,2$; $p<0,01$) signifikant niedriger. Dasselbe Bild zeigte sich bei unbehandelten Asthmapatienten ($3,3\text{pg/mL}\pm 0,3$) im Vergleich mit behandelten Asthmapatienten ($6,6\text{pg/mL}\pm 1,3$; $p<0,05$). Diese Ergebnisse weisen auf die wichtige Rolle von FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen hin als Gegenspiel induziert durch die allergenspezifische Immuntherapie bei allergischen Entzündungen.

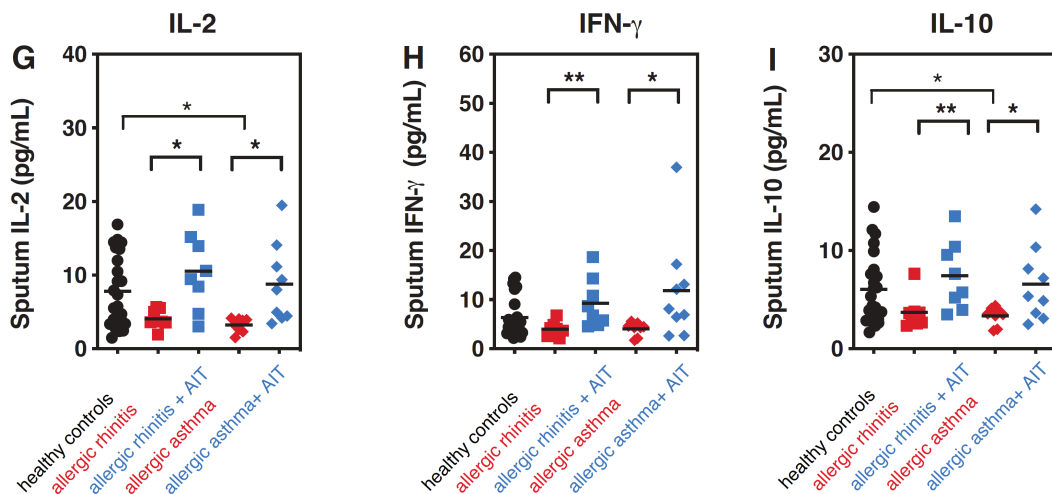


Abbildung 33: Th1 und Treg assoziierte Zytokine während der Graspollen-Saison.

Menge der Th2 assoziierten Zytokine IL-2 (A), IFN- γ (B) und IL-10 (C) bei den jeweiligen Probandengruppen während der Graspollen-Saison. Die Menge der Th1/Treg assoziierten Zytokine IL-2 (G), IFN γ (H) und IL-10 (I) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ $p<0,05$, „**“ $p<0,01$, „***“ $p<0,001$ und „****“ $p>0,0001$.

Vergleicht man Patienten mit allergischer Rhinitis (IL2: 4,1pg/mL±0,4; IFN- γ : 4,0pg/mL±0,5) oder allergischem Asthma (IL2: 3,2pg/mL±0,3; IFN- γ : 4,1pg/mL±0,5) ohne Immuntherapie mit Patienten mit allergischer Rhinitis (IL2: 10,5pg/mL±1,9,p<0,05; IFN- γ : 9,3pg/mL±1,8; p<0,01) oder allergischem Asthma (IL2: 8,8pg/mL±1,8,p<0,001; IFN- γ : 11,8pg/mL±3,5;p<0,05) mit Immuntherapie wiesen erstere sehr viel niedrigere Spiegel auf für IL-2, IFN γ und auch für IL-10 auf.

Die Ergebnisse außerhalb der Graspollen-Saison sind vergleichbar mit denen während der Graspollen-Saison, zeigen aber tendenziell etwas höhere Anstiege als während der Allergenexposition. So waren bei der Kontrollgruppe (IL2: 9,5pg/mL±1,3; IFN- γ : 10,2pg/mL±2,4) und bei Probanden mit Immuntherapie vergleichsweise höhere Spiegel (AR+AIT IL2: 11,2pg/mL±3,1; IFN- γ : 13,3pg/mL±3,9; AA+AIT IL2: 12,6pg/mL±1,9; IFN- γ : 9,8pg/mL±2,0) messbar als bei den allergischen Probanden ohne Therapie (AR-AIT IL2: 5,5pg/mL±0,5; IFN- γ : 3,7pg/mL±0,5; AA-AIT IL2: 6,3pg/mL±1,3; IFN- γ : 4,3pg/mL±0,6).

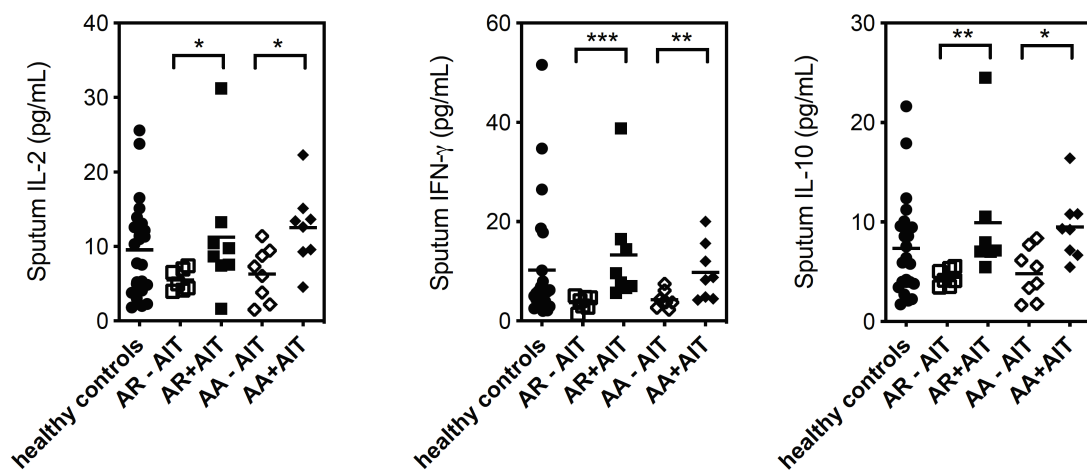


Abbildung 34: Th1 und Treg assoziierte Zytokine außerhalb der Graspollen-Saison.

Menge der Th2 assoziierten Zytokine IL-2 (A), IFN- γ (B) und IL-10 (C) bei den jeweiligen Probandengruppen außerhalb der Graspollen-Saison. Die Menge der Th1/Treg assoziierten Zytokine IL-2 (G), IFN γ (H) und IL-10 (I) wird in pg/ml angegeben. Die Signifikanz wird durch das Symbol „*“ angegeben, wobei gilt „*“ p<0,05, „**“ p<0,01, „***“ p<0,001 und „****“ p>0,0001.

Tabelle 11: Übersicht der Sputum-Zytokinlevel während der Graspollensaison.

Die Werte werden mit Mittelwert \pm Standardabweichung angezeigt. * weist auf statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe hin; # weist auf statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Rhinitisgruppe hin; \$ weist auf statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Asthmagruppe hin.

	Kontrollgruppe	Allergische Rhinitis ohne AIT	Allergische Rhinitis mit AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma ohne AIT	Allergische Rhinitis mit Asthma mit AIT
IL-4 (pg/mL)	24.8 \pm 3.4	66.1 \pm 8.4****	14.0 \pm 2.6###	51.8 \pm 11.3*	14.2 \pm 2.8\$\$\$
IL-5 (pg/mL)	30.8 \pm 3.9	71.2 \pm 5.9****	14.8 \pm 1.8###	48.8 \pm 9.7	13.6 \pm 1.7\$\$\$
IL-13 (pg/mL)	9.8 \pm 1.0	19.0 \pm 2.2***	6.5 \pm 0.8###	14.4 \pm 2.3	5.8 \pm 0.7\$\$\$\$
TGFα₁ (pg/mL)	10.2 \pm 1.4	13.7 \pm 1.7	4.1 \pm 0.7####	17.0 \pm 3.1*	5.5 \pm 0.5\$\$\$
IL-9 (pg/mL)	13.9 \pm 1.9	20.6 \pm 3.1	5.8 \pm 0.6###	19.2 \pm 4.0	4.2 \pm 0.5\$\$\$
IL-6 (pg/mL)	15.5 \pm 1.7	13.2 \pm 3.3	27.1 \pm 5.0#	11.4 \pm 2.6	48.4 \pm 20.6\$
IFN-α (pg/mL)	6.4 \pm 0.8	4.0 \pm 0.5	9.3 \pm 1.8##	4.1 \pm 0.5	11.8 \pm 3.5\$
IL-2 (pg/mL)	7.8 \pm 1.0	4.1 \pm 0.4	10.5 \pm 1.9#	3.2 \pm 0.3*	8.8 \pm 1.8\$
IL-10 (pg/mL)	6.0 \pm 0.7	3.7 \pm 0.6	7.4 \pm 1.2##	3.3 \pm 0.3*	6.6 \pm 1.3\$

3.6 Ergebnisse der Zytospins

Die Zytospins der Sputumproben wurden durch eine mikroskopische Auszählung der Zellverteilungen analysiert (siehe Tab. 12). Gezählt wurden der Anteil an Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten in den jeweiligen Probandengruppen während der Graspollen-Saison. Im Vergleich der Gruppen fällt auf, dass sich die Kontrollgruppe von den allergischen Gruppen bezüglich der Zellverteilung wenig unterscheidet. Betrachtet man den Eosinophilenanteil kann man jedoch einen Unterschied bei den Patienten mit allergischer Rhinitis ohne Immuntherapie ($2,6\% \pm 1,0$; $p=0.0653$) und bei den unbehandelten asthmatischen Patienten ($2,5\% \pm 1,5$; $p=0.1790$) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($0,5\% \pm 0,2$) finden.

Tabelle 12: Auszählung der Zytospins während der Graspollen-Saison.

Angegeben wird der Anteil an Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten in den jeweiligen Probandengruppen. Daten angegeben mit Mittelwert (\pm Standardfehler).

	Kontroll gruppe (n=26)	Allergische Rhinitis ohne AIT (n=9)	Allergische Rhinitis mit AIT (n=10)	Allergisches Asthma ohne AIT (n=10)	Allergisches Asthma mit AIT (n=9)
Tot. Zellzahl [x10⁴/mL]	47,3 \pm 8,7	134,2 \pm 31,4	42,8 \pm 9,3	178,1 \pm 94,8	19,6 \pm 2,9
Makrophagen [%]	84,9 \pm 3,0	87,0 \pm 2,0	86,6 \pm 2,7	80,5 \pm 6,6	85,2 \pm 5,8
Neutrophile [%]	14,0 \pm 3,0	9,5 \pm 1,4	11,3 \pm 2,1	15,5 \pm 4,7	14,2 \pm 5,7
Eosinophile [%]	0,5 \pm 0,2	2,6 \pm 1,0	1,0 \pm 0,2	2,5 \pm 1,5	0,4 \pm 0,2
Lymphozyten [%]	0,6 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	2,3 \pm 1,3	0,2 \pm 0,2

Ergebnisse

Auffällig zeigt sich auch die totale Zellzahl im Vergleich der einzelnen Probandengruppen. Allergische Probanden ohne Immuntherapie zeigen dabei wesentlich höhere Gesamtzellzahlen als die Kontrollgruppe oder die allergischen Gruppen mit Immuntherapie.

4. Diskussion

4.1 Studiendesign

In jeder wissenschaftlichen Arbeit ist es stets sinnvoll und sogar erforderlich, die Methodik und das Studiendesign kritisch zu hinterfragen und nach möglichen Fehlerquellen zu suchen. Diese Suche sollte sowohl die Probandengruppen, die Probenentnahme, die Probenverarbeitung und die Auswertung der Daten berücksichtigen.

4.1.1 Größe der Probandengruppen

Betrachten wir beispielsweise die Größe der Probandengruppen, so waren während der Graspollen-Saison insgesamt 58 Probanden eingeschlossen, die in eine Kontrollgruppe von 24 Probanden und eine Allergikergruppe von 34 Probanden unterteilt wurden. Die Probanden der Allergikergruppen wurden wiederum in vier Subgruppen aufgeteilt: Rhinitiker mit/ohne AIT und Asthmatiker mit/ohne AIT. Diese Unterteilung führte schlussendlich zu einer Gruppengröße von maximal 9 bei den Rhinitis-Untergruppen und minimal 8 Probanden bei den Probandengruppen mit Asthma während der Graspollen-Saison. Hinzu kommt, dass außerhalb der Graspollen-Saison nur noch 54 Probanden in die Studie eingeschlossen werden konnten, was zu einer Gruppengröße von minimal 6 Probanden in der Rhinitis-SCIT-Gruppe führte. Die geringe Größe der zu untersuchenden Gruppen ist sicherlich ein limitierender Faktor hinsichtlich der Aussagekraft der Studie. Auch wenn eine weitere Studie mit größeren Probandengruppen sinnvoll wäre, konnte jedoch bereits mit dieser Stichprobengröße eine eindeutige Tendenz mittels signifikanter Daten hervorgehoben werden.

4.1.2 Charakteristika der Probandengruppen

Analysiert man die Charakteristika der Probandengruppen, ist hervorzuheben, dass es sich hauptsächlich um junge, weitestgehend gesunde Teilnehmer handelt. Es nahmen Probanden im Alter von 19 bis 53 Jahren teil, wobei der

Großteil der Probanden (sowohl Kontrollprobanden als auch Allergiker) der Altersklasse 20-30 Jahre zuzuordnen war. Bei der Erhebung des GINA-Scores zeigte sich, dass fast alle Probanden mit Asthma sehr gut eingestellt waren und sich in einem kontrollierten Zustand befanden. Mehr als die Hälfte war nur auf Bedarfsmedikation angewiesen. Um Einflüsse jeglicher Medikation so gering wie möglich zu halten, wurden alle Probanden um eine 7-tägige Wash-Out Phase gebeten. Diesbezüglich ist folgendes zu bedenken: Einerseits ist zu erwarten, dass sich die zellulären Veränderungen durch eine allergische Erkrankung in einem Kollektiv schwerer erkrankter Asthmatiker deutlicher hervorheben als bei milder Ausprägung der Allergie. Andererseits zeigen Daten, dass eine allergenspezifische Immuntherapie bei Einsetzen in einem frühen Stadium der Erkrankung präventive Effekte auf weitere Sensibilisierungen oder Exazerbationen zeigt (Pajno et al., 2017), woraus man schließen kann, dass bei einem jungem, relativ gesunden Probandenkollektiv bessere Ergebnisse zu erwarten sind. Zusätzlich gibt es in einem jüngeren Probandenkollektiv mehr vergleichbare Daten, da die allermeisten Studien bezüglich allergischer Erkrankungen an einem jungen Probandenkollektiv durchgeführt werden. Auch wenn sich aus neueren Daten zeigt, dass ältere Patienten genauso von einer Immuntherapie profitieren würden (Ridolo et al., 2017), ist die Datenlage bezüglich älterer Patienten nach eigener Recherche aktuell noch spärlich.

4.1.3 Unterschiede in der Immuntherapie

Ein weiterer Punkt, der zu bedenken ist, betrifft jene Probandengruppen, die eine allergenspezifische Immuntherapie durchgeführt haben. Da es sich bei dieser Arbeit um keine observationale longitudinale Studie handelt, konnte nicht gewährleistet werden, dass alle Probanden homogene Daten bezüglich der AIT aufwiesen. Vielmehr war in dieser Arbeit ein cross-sectionales Design angestrebt worden. So war die AIT zwar nicht bei allen Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme abgeschlossen, jedoch lag bei jedem Patienten mindestens ein Jahr Behandlung einer AIT vor.

Grundsätzlich variiert die Dauer der Behandlung einer AIT zwischen 3 und 5 Jahren. Ob eine Immuntherapie 3 oder 5 Jahre lang durchgeführt wird, soll

individuell entschieden werden, abhängig von Schweregrad, Ansprechen auf die Therapie, anaphylaktischen Reaktionen in der Vergangenheit und Patientenwunsch (L. Cox et al., 2011; Pajno et al., 2017).

Nicht bei allen Probanden wurde die allergenspezifische Immuntherapie in derselben Darreichungsform durchgeführt. Bei einem Großteil wurde die Immuntherapie subkutan verabreicht (SCIT), während bei einzelnen die Therapie in sublingualer Form (SLIT) durchgeführt wurde. Ob die Darreichungsform einen Einfluss auf den Effekt der Therapie hat, ist nicht eindeutig geklärt, da die aktuelle Datenlage zum direkten Vergleich zwischen subkutaner und sublingualer Darreichungsform unzureichend ist. Jedoch wurde 2013 in einer Meta-Analyse durch indirekten Vergleich aufgezeigt, dass beide Formen der Immuntherapie zu signifikanten Vorteilen im Vergleich zu Placebo führten. Dabei konnte jedoch nicht identifiziert werden, ob und welche Methode der anderen überlegen sei (Dretzke et al., 2013).

4.1.4 Probenentnahme

Um einen Vergleich zwischen während und außerhalb der Graspollen-Saison (Pollenflug) untersuchen zu können, wurden Probanden mit saisonaler Allergie in die Studie einbezogen. Entscheidendes Kriterium dafür war die Gräserallergie. Bei einem Großteil der Probanden war jedoch zusätzlich auch eine Birkenallergie mittels Pricktest diagnostiziert worden. In einigen Fällen konnte sogar eine Milbenallergie und eine Katzenallergie festgestellt werden. Daher kann eine unter Umständen ganzjährige Allergenexposition und damit eine Beeinflussung der Ergebnisse vor allem außerhalb der Graspollen-Saison, wo eine ausbleibende Exposition gewünscht war, nicht ausgeschlossen werden. Dabei kann jedoch die Erhebung der Klinik während und außerhalb der Graspollen-Saison mittels RQLQ und GINA-Score herangezogen werden, um eine eindeutige Saisonalität der Symptome hervorzuheben. Im Vergleich der Werte konnte gerade bei den Rhinitikern eine stark ausgeprägte Saisonalität festgestellt werden, die in direktem Zusammenhang mit der Allergenexposition zu werten ist. Auch bei den asthmatischen Patienten konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen Graspollen-Saison und außerhalb der Graspollen-Saison ausgemacht

werden, wenn auch nicht so stark ausgeprägt. Das lässt sich auf verschiedene Trigger zurückführen, die das asthmatische Bild neben Allergenexposition ebenfalls beeinflussen, wie Kälte oder Virusinfektionen, die vor allem in den Wintermonaten vorkommen und somit Einfluss auf die Saisonalität der Symptome nehmen können (Jartti & Gern, 2017; Seys et al., 2013).

Der Probenentnahmezeitpunkt wurde mithilfe eines Pollenflugkalenders festgelegt. Der Zeitraum der Graspollen-Saison umfasste eine Spanne von Mai bis Juli. Innerhalb dieses Zeitraums können die Bedingungen trotz Pollenflugkalenders aufgrund individuell unterschiedlicher Allergenexposition schwanken, was als äußerer Einflussfaktor bedacht werden muss.

Außerhalb der Graspollen-Saison von Oktober bis Dezember sind aufgrund fehlenden Pollenflugs weniger individuelle äußere Einflussfaktoren zu erwarten.

4.1.5 Sputumqualität

Um die bestmögliche Qualität des Probenmaterials zu garantieren, soll das Sputum nach der Entnahme auf Eis aufbewahrt und innerhalb von zwei Stunden verarbeitet werden, um zu verhindern, dass die Qualität des Sputums im Laufe der Zeit und bei Raumtemperatur ab und der Anteil an toten Zellen zunimmt (John V. Fahy, Liu, Wong, & Boushey, 1993; E. Pizzichini et al., 1996). Verzögerungen der Bearbeitung führen dazu, dass vermehrt Zellen absterben und RNA und Proteine degenerieren. Eine Analyse der Sputumqualität konnte anhand der Anzahl der lebenden und der toten Zellen erfolgen. Jede Probe wurde streng nach Protokoll mithilfe der Trypan-Blau-Methode in der Neubauer-Zählkammer innerhalb von 5 Minuten nach Anfärbung ausgezählt, um den prozentualen Anteil von lebenden und squamösen Zellen zu ermitteln. Der Grenzwert für Plattenepithelzellen in den Proben war bei 15% festgelegt. Der Grenzwert als Qualitätsmerkmal war in der Dissertation von Dr. Zissler (2012) etabliert worden. Die Qualität des Sputums zeigte sich sehr hoch mit einem durchschnittlichen Anteil von 9,6% squamöser Zellen während der Graspollen-Saison und einem durchschnittlichem Anteil von nur 3,9% außerhalb der Graspollen-Saison. Die

Qualitätssteigerung zwischen Graspollen-Saison und außerhalb der Graspollen-Saison lässt sich unter anderem auf die Lernkurve in der Umsetzung der SOPs (U. M. Zissler, 2012) zurückführen. Ein ähnliches Phänomen lässt sich bei der Zellviabilität betrachten. Auch hier kam es zu einem Qualitätssprung zwischen Graspollen-Saison mit einem Anteil von 68,8% an Lebendleukozyten und einem Anteil von 94,9% außerhalb der Graspollen-Saison. Das kann sich auch durch die Tatsache erklären lassen, dass die Probanden bei der zweiten Probenentnahme mit dem Ablauf vertraut waren und daher dieser reibungsloser sowie gerade das Abhusten des Sputums mit weniger Anläufen ablaufen konnte.

4.1.6 Gating Strategie

Ein häufig kritizierter Punkt bei der Analyse von Daten mittels Durchflusszytometrie ist das Gating. Dabei werden anhand gemeinsamer Merkmale Zellpopulationen definiert, um diese quantifizieren und untersuchen zu können. Diese Merkmale können sich unter anderem auf Zellgröße, Zellzyklus oder Fluoreszenzen beziehen. Somit bestimmt man selbst, nach welchen Kriterien Zellen gefiltert werden und welche Kriterien einen Zelltyp als solchen ausmachen. In dieser Arbeit wurden mittels Gating Th9, Th2 und regulatorische T-Zellen untersucht und die Kriterien, um dieses anzuwenden, wurden nach wissenschaftlichen Erkenntnissen gewählt.

Initial wurde ein Gate auf die vereinzelt Zellen (Singletten) gelegt, gefolgt von einem Gate auf Lymphozyten und lebende Zellen (negative Fixability Färbung). Das weitere Gating der Th9-Zellen erfolgte durch Identifizierung von CD3 positiven und CD4 positiven Th-Zellen und in einem weiteren Schritt durch die Expression von IL9. Diese Gating Strategie basiert auf Daten, die nachweisen konnten, dass Th9-Zellen durch ausgeprägte Produktion von IL-9 gekennzeichnet sind (Mark H. Kaplan, 2013).

Th2-Zellen wurden ebenfalls auf der Grundlage von CD3 positiven und CD4 positiven Th-Zellen und anschließend anhand von GATA3-Expression als solche herausgefiltert. Die Rolle von GATA3 in der Differenzierung zu Th2-Zellen ist schon lange bekannt und wurde im Laufe der Forschung immer wieder bestätigt (Yagi, Zhu, & Paul, 2011; Zheng & Flavell, 1997).

Für die regulatorischen T-Zellen wurde nach dem initialen Gating die Populationen der CD3 positiven CD4 positiven Th-Zellen gefolgt von FoxP3 eingegrenzt, das als Schlüssel-Transkriptionsfaktor von regulatorischen T-Zellen bekannt ist (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003). Um maximale Sicherheit zu garantieren und die individuelle Setzung der Auswerteregion zu objektivieren, wurde jedes Gating für Sputumproben zusätzlich durch ein Backgating rückgesichert. Durch das Gating auf Singletten, Filtern durch den Fixable Viability Stain, das spezifische Targeting auf wissenschaftlicher Grundlage sowie das Backgating wurde die bestmögliche Qualität der finalen Analyse angestrebt.

4.2 Klinische Daten

4.2.1 Lungenfunktion

Die Lungenfunktionstestung eines jeden Probanden wurde durchgeführt, um einerseits die einzelnen Gruppen (Rhinitiker und Asthmatiker versus Kontrollgruppe) als solche zu definieren und charakterisieren, andererseits um den Schweregrad der asthmatischen Erkrankung einschätzen zu können. Zu erwarten wäre eine deutlich schlechtere Lungenfunktion bei Asthmatikern. Allerdings zeigen sich in den Ergebnissen der FEV1 oder FVC kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Im Gegenteil, so zeigen sich tatsächlich in der FEV1 bessere Werte bei den Patienten mit Asthma ohne Immuntherapie im Vergleich zur Probandengruppe (siehe Tab. 10). Das lässt sich einerseits dadurch erklären, dass die Asthma-Patienten sehr gut eingestellt sind und bei den meisten nur ein mildes Asthma vorliegt. Die Hälfte der Patienten ist nur auf Bedarfsmedikation angewiesen. Andererseits ist nicht zu vergessen, dass Asthmatiker in der Regel mit der Lungenfunktionstestung vertraut sind, während das bei der Kontrollgruppe nicht der Fall ist. Dadurch ergibt sich durch die bestehende Lernkurve bei mehrfacher Ausführung dieser Messung von Seiten des Patienten eine Beeinflussung der Lungenfunktionsmessung.

4.2.2 Rhinoconjunctivitis Quality of Life mini Questionnaire (mRQLQ)

Mithilfe des mRQLQ-Wertes als Spiegel des klinischen Bildes und der Einschränkung durch die allergische Erkrankung des Patienten kann aufgezeigt werden, ob die klinischen Symptome der Probanden der Zuordnung zu den jeweiligen Gruppen mithilfe Prick-Test und IgE entsprechen (Juniper & Guyatt, 1991). Um eine allergische Rhinitis oder ein allergisches Asthma zu diagnostizieren, bedarf es des Zusammenspiels von diagnostischem Test und Klinik. Diagnostische Tests alleine reichen nicht aus, um die Diagnose stellen zu können (Varshney & Varshney, 2015). Daher ist die Anamnese und Bewertung des Ausmaßes der Klinik von großer Relevanz.

Aus der Tab. 10 ist ersichtlich, dass die allergischen Gruppen sich deutlich von der Kontrollgruppe hinsichtlich der klinischen Beschwerden unterscheiden. Auch zeigen sich Unterschiede zwischen allergischen Probanden mit oder ohne Immuntherapie. Somit konnten Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten bestätigt werden, die zeigten, dass eine Immuntherapie positiven Einfluss auf den mRQLQ-Score hat (Rondón et al., 2018). Wirft man einen Blick auf die Auswertung des mRQLQ-Scores bei fehlender Allergenexposition, wird deutlich, dass die Patienten von einer saisonalen Allergie betroffen sind. Die Erhebung des Scores ergab dort deutlich niedrigere Werte als während der Graspollen-Saison.

4.2.3 GINA-Score

Die Auswertung des GINA-Scores ("Global Strategy for Asthma Management and Prevention," 2017) ergab, dass bei den asthmatischen Probanden in dieser Studie ein mildes und sehr gut eingestelltes Asthma vorlag. Der GINA-Score ergab bei lediglich einem Patienten unkontrolliertes Asthma. Dies spiegelt sich auch in der Lungenfunktionsmessung wider (siehe 4.2.1), wo sich die Werte der Patienten mit Asthma kaum von denjenigen ohne Asthma unterscheiden. Allerdings konnte anhand des GINA-Scores ein Unterschied innerhalb der Asthmapatienten in Hinsicht auf eine erfolgte Immuntherapie aufgezeigt werden. Der GINA-Score bei den Probanden mit Immuntherapie war deutlich niedriger als bei Probanden ohne Immuntherapie. Klinisch bestätigt sich somit, was aus vorherigen Studien bekannt ist (Burks et al., 2013) und entspricht den Ergebnissen auf zellulärer Ebene der durchflusszytometrischen Analysen und Proteinanalysen dieser Arbeit.

4.3 Durchflusszytometrische Analyse und Zytokine in Sputum- überständen

Das Th1- und Th2-Modell mit der These eines Ungleichgewichts zu Gunsten der Th2-Zellen von Mosmann und Coffman (1989) als Erklärung der Pathogenese bei allergischen Erkrankungen hatte sich als zu vereinfacht erwiesen, um die komplexen zellulären Vorgänge zu erklären (Berker et al., 2017). In den letzten Jahren stellte sich immer mehr heraus, dass weitere verschiedene T-Helferzellen wie Th17, Th9 und regulatorische T-Zellen einen wichtigen Teil zur Immunantwort beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge vor allem der CD4 positiven T-Helferzellen beizutragen. Es sollte die Rolle der Th2, Th9 und regulatorischen T-Zellen bei saisonalen allergischen Erkrankungen genauer untersucht werden. Besonderes Augenmerk lag dabei unter anderem auch auf der allergenspezifischen Immuntherapie und deren Auswirkung auf zellulärer Ebene. Während bisherige Studien vor allem auf Mausmodellen oder humanen Serumproben basieren (Angkasekwinai, 2019; Devos et al., 2006; Staudt et al., 2010), wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Analyse von induziertem Sputum gelegt, welche es ermöglicht, Einblick in die immunologischen Vorgänge in den unteren Atemwegen zu erhalten. Um einen Vergleich der lokalen zur systemischen Immunantwort ziehen zu können, wurden die Untersuchungen des Sputums mit Analysen von humanen PBMCs ergänzt. Somit fußen die Aussagen in dieser Arbeit auf mehreren Schienen, die gegenseitig deren jeweilige Aussagekraft bestätigen konnten. Es konnten sowohl bisherige Erkenntnisse bestätigt werden als auch erstmals nachgewiesen werden, dass Th9-Zellen durch allergenspezifische Immuntherapie (AIT) in den unteren Atemwegen beeinflusst werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse erläutert und diskutiert.

4.3.1 Einfluss von Immuntherapie auf Th2-, Th9- und regulatorische T-Zellen

Die allergenspezifische Immuntherapie ist bisher die einzig kausale Therapiemöglichkeit bei allergischen Erkrankungen. Sie reduziert Symptome und den Bedarf an Medikation deutlich, auch nach Beendigung der Therapie (Dhami, Kakourou, et al., 2017). Der Mechanismus hinter der Immuntherapie liegt an der Induktion einer peripheren T-Zelltoleranz (Fujita et al., 2012). Diese Regulierung kann basierend auf dem aktuellen Forschungsstand entweder durch eine verminderte Differenzierung von Th2-Zellen oder durch eine TGF β -regulierte Treg-Antwort erklärt werden (Kayhan T. Nouri-Aria, Pilette, Jacobson, Watanabe, & Durham, 2005). Aus bestehenden Daten weiß man, dass TGF β auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung für Th9-Zellen spielt (Dardalhon et al., 2008; M. Veldhoen et al., 2008).

Die bisherigen Erkenntnisse zu Veränderungen der Th2-Zellantwort in Zusammenhang mit allergenspezifischer Immuntherapie konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Sowohl bei den Rhinitikern als auch bei den asthmatischen saisonalen Allergikern erscheint bei erfolgter Immuntherapie die Th2-Immunantwort in den unteren Atemwegen signifikant herabgesetzt zu sein. Besonders ausgeprägt zeigt sich dieses Phänomen bei Probanden mit allergischer Rhinitis. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass bei Asthma eine allergenspezifische Immuntherapie nicht so wirksam ist wie bei allergischer Rhinitis. So ist in den ARIA-Guidelines eine Immuntherapie bei Asthma wegen schwacher Evidenz nur bedingt empfohlen (Brožek et al., 2010).

Erwartungsgemäß zeigte sich in dieser Arbeit eine Induktion von Th9-Zellen bei Rhinitikern in der Pollensaison, während diese bei den gesunden Probanden oder nach durchgeführter AIT auf niedrigem Niveau blieben. Der saisonale Anstieg von Th9-Zellen sowie auch Th2-Zellen in den unteren Atemwegen zeigte sich bei Probanden mit AIT ausbleibend, was mit den bisherigen Erkenntnissen übereinstimmt, die zeigten, dass IL-9 und IL-5 in den unteren und in den oberen Atemwegen durch AIT reduziert werden (Kohno et al., 1998; Kayhan T. Nouri-Aria et al., 2005). Zusätzlich zeigten auch die Th2 assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 eine unterschiedliche Regulierung in Sputum-Überständen bei Patienten mit AIT im Vergleich zu unbehandelten

Patienten. Auch dies stimmt mit vorherigen Studien überein, die zeigten, dass allergenspezifische IL-4 produzierende Th2-Zellen in allergischen Patienten stark exprimiert werden (Akdis et al., 2004) und diese durch AIT vermindert werden können (Ulrich M. Zissler et al., 2018).

Im Gegensatz zur saisonalen Th2-Zellvorherrschaft in den unteren Atemwegen bei Allergikern zeigten regulatorische T-Zellen eine starke Präsenz im Sputum gesunder Probanden über die saisonale Allergenexposition hinaus und zeigten sich vermindert bei allergischen Rhinitikern und Asthmatikern unabhängig der Allergenexposition. Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Studien, dass CD25⁺FOXP3⁺Tregs bei gesunden Probanden in den unteren Atemwegen vorkommen, während diese bei Asthmatikern in geringerer Anzahl zu finden sind (Kawayama et al., 2013; U. M. Zissler et al., 2018).

Sowohl für die Th9- und Th2-Zellen als auch für die regulatorischen T-Zellen konnten somit deren Rollen in der allergischen Pathogenese bestätigt werden: Th9 und Th2 als proinflammatorische Zellen, die vermehrt bei allergischen Patienten unter Allergenexposition nachgewiesen werden konnten; antiinflammatorische Treg Zellen, die modulierend auf die allergische Immunantwort wirken und vermehrt bei gesunden Probanden und nach erfolgter Immuntherapie festgestellt werden konnten.

4.3.2 Periphere Immunantwort und lokale Atemwegs-entzündung

Der Mehrwert dieser Studie liegt unter anderem auch im Vergleich der peripheren Immunantwort und der Untersuchung der zellulären Veränderung in den unteren Atemwegen mithilfe des induzierten Sputums. Relativ früh erkannte man den Vorteil von induziertem Sputum als nicht invasive Untersuchungsmethode der unteren Atemwege (Pavord, Pizzichini, Pizzichini, & Hargreave, 1997). Auch wenn Th9-Zellen lokal in den Atemwegen im Vergleich zu Serum stärker nachgewiesen werden konnten (Iinuma et al., 2015), findet man dennoch vorrangig Studien anhand von Mausmodellen oder im Blut von Patienten. Da in dieser Arbeit bei jedem Probanden sowohl Sputum- als auch PBMC-Proben entnommen wurden, ermöglicht dies, einen

direkten Vergleich zwischen der lokalen und der systemischen Immunantwort zu ziehen.

An sich ergab die Analyse der systemischen Immunantwort ein ähnliches Bild wie die Sputumanalyse. So zeigten auch hier Allergiker eine vermehrte Expression von Th2- und Th9-Zellen, während Treg Zellen von gesunden Probanden stärker exprimiert wurden. Jedoch zeigte sich die Immunantwort in den unteren Atemwegen im Vergleich mit der systemischen bei den allergischen Probanden stärker ausgeprägt und in direktem Zusammenhang mit der Allergenexposition. So sank der Anteil an Th2- und Th9-Zellen zwischen Allergiesaison und fehlender Allergenexposition im Sputum stärker als peripher. Gegeben der Tatsache, dass in den Atemwegen der erste Kontakt mit dem aerogenen Allergen stattfindet, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Dass akute Veränderungen durch induziertes Sputum wiedergegeben werden können, zeigen Studien durch Messung vor und kurz nach Stimulation in den Atemwegen (Gauvreau, Doctor, Watson, Jordana, & O'Byrne, 1996; M. M. Pizzichini et al., 1996). Die direkte Anpassung der systemischen Immunantwort auf Allergenexposition oder bei ausbleibender Allergenexposition zeigte sich im Vergleich nicht so schnell reagibel. Die Unterschiede während und außerhalb der Graspollen-Saison zeigten sich bei den PBMC-Proben viel geringer als im Sputum. Eine Hypothese, die dieses Phänomen erklären würde, ist die sogenannte „Poolhypothese“. Peripher sammeln sich allergieassoziierte Zellen und inflammatorische Zytokine an und bilden dort einen Pool, der erst langsam abgebaut werden muss und dazu führt, dass selbst bei ausbleibender Allergenexposition die Spiegel der inflammatorischen Zellen langsamer sinken. Diese These unterstreicht nochmals die Bedeutung von Analysen des induzierten Sputums als Spiegelbild dessen, welche Vorgänge sich zum aktuellen Zeitpunkt der Probenentnahme in den unteren Atemwegen abspielen. Somit ist ein besseres Verständnis der lokalen entzündlichen Geschehnisse gewährleistet.

4.3.3 Zytokine – Modulatoren der allergischen Immunantwort

Zur Untermauerung der oben beschriebenen durchflusszytometrischen Resultate diente die Analyse von Zytokinen aus Sputum-Überständen. Seit

der Charakterisierung der T-Helferzellen in ihre Subpopulationen, die sich im Profil der von ihnen produzierten Zytokine unterscheiden, hat man sich auch vermehrt mit der Rolle der Zytokine bei allergischen Reaktionen befasst. So konnte man nicht nur aufzeigen, dass Th2 assoziierte Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 verantwortlich für eine vermehrte IgE-Produktion von B-Zellen, Eosinophilenaktivierung und Mukusproduktion sind und somit unmittelbar mit allergischen Reaktionen assoziiert sind (Bellanti, 1998), sondern auch nachweisen, dass diese Zytokine sich nach einer allergenspezifischen Immuntherapie verändern (M. Jutel, Akdis, Blaser, & Akdis, 2006). Diese bisherigen Erkenntnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Parallel zu den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie zeigten sich im Sputum von Allergikern erhöhte Spiegel von IL-4, IL-5 und IL-13, Th2 assoziierte Zytokine.

4.3.3.1 IL-5 und Eosinophile

IL-5 steht dabei in einem engen Zusammenhang mit Eosinophilie (Takatsu & Nakajima, 2008). So konnten bei rhinitischen und asthmatischen Probanden ohne erfolgte Immuntherapie eine erhöhte Eosinophilenanzahl nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe der Anteil der gezählten Eosinophilen und Lymphozyten im Großen und Ganzen dem zu erwartenden Anteil einer Normverteilung entspricht. Bei erfolgter Immuntherapie gleichen sich die Eosinophilenspiegel denen gesunder Probanden an.

Das ist nicht überraschend. Laut mehrerer Studien sind bei allergischen Entzündungsreaktionen mit erhöhten Werten an eosinophilen Granulozyten im Blut zu rechnen (Amin et al., 2020; Kovalszki & Weller, 2016; Uhm, Kim, & Chung, 2012). Entsprechend erwartet man auch im induzierten Sputum von Allergikern erhöhte Eosinophilenwerte. Bei Kindern mit Asthma zeigten sich eine erhöhte Eosinophilenanzahl im Sputum und diese korreliert auch mit der erhöhten Frequenz von Asthmaepisoden (Gibson, Simpson, Hankin, Powell, & Henry, 2003). Tatsächlich erweist sich die Eosinophilie im Sputum als besserer Marker als Eosinophilie im Blut (Emilio Pizzichini, Pizzichini, Efthimiadis, Dolovich, & Hargreave, 1997). Die Zytospinanalyse als Goldstandard der Zellverteilung in induziertem Sputum spielt bei der Analyse eine entscheidende Rolle.

Die niedrigeren Eosinophilenspiegel nach Immuntherapie sind ebenfalls nichts Neues. Bereits in den frühen 90er Jahren konnten in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) immuntherapierter Patienten eine verminderte Anzahl an Eosinophilen im Vergleich zu unbehandelten Patienten gemessen werden (Rak, Björnson, Håkanson, Sörenson, & Venge, 1991). Dies lässt sich durch eine Senkung der IL-5 Expression (siehe Tab. 12) erklären, die unter anderem verantwortlich sind für die Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen (O'Byrne, Inman, & Parameswaran, 2001).

Doch nicht nur IL-5, sondern auch IL-9 steht in Zusammenhang mit der Freisetzung von Eosinophilen. So erreichte man durch Anti-IL9-Antikörper eine Reduzierung von Eosinophilen in den Atemwegen (Kim et al., 2013). Das Vorhandensein von TGF β steht in Zusammenhang mit einer Erhöhung der Eosinophilenzahl (Luttmann, Franz, Matthys, & Virchow, 1998), wobei es so scheint als würde die TGF β Produktion von Eosinophilen induziert werden (Kato et al., 2005). Sowohl die IL-9 als auch die TGF β Spiegel verhalten sich konkordant zu den Eosinophilenspiegel bei den Allergikergруппen mit und ohne Immuntherapie (siehe Tab. 11 und 12). Eine Verhinderung des Anstiegs der Eosinophilenzahl bei Allergenexposition durch Immuntherapie in den oberen Atemwegen (nasale Mukosa) konnte bereits nachgewiesen werden (Wilson et al., 2001), während sich in dieser Arbeit eine geringere Anzahl an Eosinophilen auch in den unteren Atemwegen bei immuntherapierten Allergikern zeigte. Dennoch gilt die Eosinophilenzahl nicht als guter Biomarker für allergische Erkrankungen oder als Erfolgsmarker nach erfolgter Immuntherapie (Cafone, Ruffner, & Spergel, 2020).

4.3.3.2 IL-9 und TGF β – proinflammatorische Zytokine

Erstmals konnte in dieser Arbeit auch für das den Th9-Zellen zugeschriebene Zytokin IL-9 eine Modulation in den unteren Atemwegen durch Immuntherapie nachgewiesen werden. Es zeigten sich signifikant niedrigere IL-9-Spiegel bei den allergischen Probanden mit erfolgter Immuntherapie im Vergleich zu nicht-therapierten Patienten. Dieses Resultat entspricht somit den verminderten Th9-Spiegeln nach erfolgter Immuntherapie sowohl im Sputum als auch in den PBMCs der allergischen Probanden. An dieser Stelle kommt aufgrund der

aktuellen Datenlage allerdings die Frage auf, ob Th9-Zellen tatsächlich als eigene Subpopulation bewertet werden sollen. Dafür spricht unter anderem eine Studie an Mausmodellen, die nachweist, dass bei Ausschaltung des Th9-Zellen-assoziierten Transkriptionsfaktors PU.1 eine IL-9 Expression ausbleibt, während die Th2-Zellantwort nicht beeinflusst wird (Chang et al., 2010). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Neutralisation von IL-9 nur bei Th9-Zellen einen lindernden Effekt auf Asthmasymptome hervorrufen konnte, während Th2-Zellen davon unbeeinflusst blieben (Staudt et al., 2010). Dem widersprechend erschien 2019 eine Publikation, die Th9-Zellen als eigenes Subset in Frage stellt und IL-9 produzierende T-Helferzellen als eine Untergruppe von Th2-Zellen definiert (Micossé et al., 2019). Gleichzeitig bleiben viele Fragen unbeantwortet, wie die der genauen Mechanismen, die dazu führen, dass manche Th2-Zellen IL-9 exprimieren und andere nicht. Unbestritten bleibt aber der Effekt des Zytokins IL-9 in allergischen Erkrankungen. Über eine Mastzellaktivierung (Noelle & Nowak, 2010) und eine verstärkte IgE-Sekretion gemeinsam mit IL-4 (Jia et al., 2017) fördert IL-9 allergische Entzündungen und ist somit ein bedeutender Faktor in der allergischen Pathogenese.

Die Expression von TGF β , das für die Induktion von Th9-Zellen eine zentrale Rolle spielt (Dardalhon et al., 2008; M. Veldhoen et al., 2008) wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls gemessen. Auch hier korrelierten die Resultate mit dem bisherigen Wissenstand, dass TGF β bei saisonalen Allergikern im Vergleich zu gesunden Probanden in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden kann (Tyurin et al., 2017). Interessanterweise waren in unseren Analysen erhöhte Spiegel von TGF β bei Allergikern ohne erfolgter AIT im Vergleich zu behandelten Allergikern messbar und unterstreichen somit die proallergische Rolle von TGF β . Das steht im Gegensatz zu Studien, die TGF β eine supprimierende Rolle in der allergischen Immunantwort zuschreiben (Akdis et al., 2004) und einen Anstieg von TGF β und IL-10 nach einem Jahr nach AIT feststellen konnten (Kouzegaran et al., 2018). Die viel diskutierte Rolle des pleiotropen TGF β erweist sich als sehr komplex - nicht zuletzt wegen der vielfachen Signalwege, die drei TGF- β Isoformen, vier Rezeptoren und eine Reihe von weiteren Einflüssen umfassen (Travis & Sheppard, 2014). Die

Rolle von TGF β zeigt stark kontextgebunden sowohl proallergische als auch immunsuppressive Funktionen auf (Weissler & Frischmeyer-Guerrero, 2019). So gibt es einerseits Hinweise, dass TGF β ähnlich wie IL-9 eine aktivierende Rolle in humaner (Ulrich M. Zissler et al., 2018) und muriner (Jones et al., 2012) Typ-2 Entzündung spielt, andererseits führt TGF β in Anwesenheit eines T-Zell-Rezeptors zur Induktion einer FoxP3-Expression und Differenzierung in regulatorische T-Zellen (Chen et al., 2003; Fantini et al., 2004). Die Daten dieser Arbeit in Zusammenhang mit murinen Daten zeigten jedoch, dass eine Ablation von TGF β zu verminderten Th2-, Th9- und Th17-Antworten bei Allergenexposition führt, während Treg-Zellen unabhängig davon ansteigen. Nach erfolgter AIT kommt es zu einer Suppression von Th2- und Th9-Zellen einhergehend mit einer verringerten TGF β und IL-9 Sekretion – ein weiterer Hinweis der proinflammatorischen Funktion von TGF β (Musiol et al., 2021).

4.3.3.3 Regulatorische T-Zellen als Immunmodulatoren

Regulatorische T-Zellen wiederum sind dafür bekannt Th2-getriebene Entzündungsreaktionen zu unterdrücken und zu einer Allergentoleranz zu führen (Oscar Palomares et al., 2010). So konnten nach erfolgter AIT, sowohl als SCIT als auch als SLIT verabreicht, vermehrt CD4 positive CD25 positive FoxP3 positive regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden (Xian et al., 2020). Anders als Th2-Zellen sind regulatorische T-Zellen im Sputum von gesunden Probanden das ganze Jahr über unabhängig von Allergenexposition vorhanden. Erstaunlicherweise zeigten Patienten mit allergischer Rhinitis konstant nur ein Drittel der regulatorischen T-Zellen von gesunden Probanden auch abseits der Allergenexposition. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Studien überein, in denen CD25 positive FoxP3 positive regulatorische T-Zellen durchgängig bei gesunden Probanden in den unteren Atemwegen nachweisbar waren und bei Asthmatikern in geringerer Menge nachgewiesen wurden (Kawayama et al., 2013). Bei allergischen Patienten mit erfolgter Immuntherapie mit und ohne Asthma zeigte sich der Mangel an regulatorischen T-Zellen wieder dem Spiegel gesunder Probanden angepasst. Dem Zytokin IL-10 wird eine breit immunsuppressive Wirkung zugeschrieben (Calzada, Baos, Cremades-Jimeno, & Cárđaba, 2018), für IL-

2 konnten immunmodulierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Bonnet et al., 2016) und es konnte ein Zusammenhang zwischen einer IFN γ -Induktion und einer allergenspezifischen Immuntherapie hergestellt werden (Ciprandi, Sormani, Filaci, & Fenoglio, 2008). Die den regulatorischen T-Zellen und den Th1- Zellen zugeschriebenen Zytokine IL-2, IFN- γ und IL-10 verhielten sich im Sputum entsprechend der regulatorischen T-Zellen und kamen vermehrt bei Allergikern mit erfolgter Immuntherapie vor und bestätigten somit bisherige Erkenntnisse.

4.3.3.4 IL-6 und Makrophagen

Ähnlich wie die immunmodulierenden Zytokine IL-2, IL-10 und IFN- γ zeigte sich in den Sputumanalysen generell niedrige IL-6 Spiegel bei den Rhinitikern und Asthmatikern ohne Immuntherapie und erhöhte Spiegel bei erfolgter Immuntherapie. Es scheint als würde eine erfolgte Immuntherapie einen fördernden Einfluss auf die IL-6 Expression haben. Allerdings zeigte die gesunde Kontrollgruppe bezüglich IL-6 eine geringe Exprimierung – anders als bei IL-2, IL-10 oder IFN- γ . Ein Ergebnis, das Fragen aufwirft - wurde das Zytokin IL-6 doch bereits mehrfach als proinflammatorisch eingestuft. Das in der Literatur als pleiotrop beschriebene Zytokin wird unter anderem von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen freigesetzt (Kamimura, Ishihara, & Hirano, 2003). In einigen Studien zeigte sich IL-6 als proinflammatorisches Zytokin und schien Teil der Pathogenese bei Asthma zu sein. Es wurde sogar als Biomarker für Asthma beschrieben (Poynter & Irvin, 2016). Andererseits konnte eine modulierende Wirkung in Richtung Th2-Immunantwort durch IL-6 aufgezeigt werden (Gubernatorova et al., 2018; Rincón, Anguita, Nakamura, Fikrig, & Flavell, 1997) auch in Zusammenhang mit Th17-Zellen (Lin, Chen, & Wang, 2016). In der Literatur ist man sich also bezüglich der tatsächlichen Rolle von IL-6 uneins. So wurde IL-6 als sehr unspezifischer Entzündungsmarker beschrieben (König et al., 2015). Eine Korrelation mit erniedrigter IFN- γ Spiegel bei IL-6 Knockout-Mäusen weist auf eine immunmodulatorische Wirkung in Richtung Th1-Antwort hin (Gubernatorova et al., 2018).

An anderer Stelle gibt es Hinweise, dass IL-6 bei allergischem Asthma eine protektive Rolle im Verlauf der Erkrankung spielt (Wang, Homer, Chen, & Elias, 2000). Das würde mit den erhöhten IL-6 Levels bei Patienten mit erfolgter Immuntherapie übereinstimmen. Man könnte also vermuten, dass IL-6 nicht in direktem Zusammenhang mit klinischen Symptomen steht, sondern vielleicht generell mit inflammatorischen Veränderungen in den Atemwegen assoziiert ist. So war IL-6 auch in asymptomatischen Asthmapatienten erhöht nachzuweisen (Yokoyama et al., 1995). An anderer Stelle wurde die These aufgestellt, dass IL-6 nicht direkt mit einem inflammatorischen Geschehen zusammenhängt, sondern mit einem aktivierten Zustand von Atemwegsepithel (Rincon & Irvin, 2012). Gerade bei asthmatischen Patienten ist das Atemwegsepithel vorsensibilisiert und kann auch durch andere Reize wie Kälte oder Virusinfektionen getriggert werden und sich somit in aktiviertem Zustand befinden, auch unabhängig von einer Allergenexposition. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-6 durch Virusinfektion und Übergewicht beeinflusst wird (Hirano, 1998; Rincon & Irvin, 2012). Auch wenn der BMI aller Probanden sehr homogen und im Normbereich war und symptomatische Virusinfektionen zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu einem Ausschluss des Probanden aus der Studie geführt hätten, kann man allergenunabhängige Interferenzen nicht mit Sicherheit ausschließen. Außerdem kann es bei einer AIT auch zu Einflüssen in den Atemwegen kommen und somit zu einem aktivierten Zustand des Atemepithels. Dies könnte eine Erklärung der erhöhten IL-6 Werte bei allergischen Probanden nach erfolgter Immuntherapie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und allergischen Probanden ohne Immuntherapie sein.

In der Zytospinanalyse von induziertem Sputum konnte bei allen Gruppen ein verhältnismäßig sehr hoher Anteil an Makrophagen festgestellt werden. Bei einem gesunden Probanden würde man in induziertem Sputum einen Anteil von $69,2 \pm 13\%$ Makrophagen, $27,3 \pm 13\%$ von Neutrophilen, $0,6 \pm 0,8\%$ von Eosinophilen, $1,0 \pm 1,2\%$ von Lymphozyten und $1,5 \pm 1,8\%$ von Epithelzellen erwarten (Spanevello et al., 2000). Somit liegt der Anteil an Makrophagen (siehe Tab. 12) bei allen Probandengruppen höher als von Spanevello et. al als Richtwert angegeben. Allerdings liegen die Zahlen noch im Rahmen der

Normalverteilung - innerhalb der 90. Perzentile, die laut Belda et. al bei 86,1% liegt (2000). Bei Beobachtung der Zellverteilung der allergischen Probandengruppen vor allem der Asthmapatienten bei erfolgter AIT bleibt der hohe Anteil an Makrophagen erhalten. Dieser geht auf Kosten des Neutrophilenanteils, der sich dementsprechend viel niedriger zeigt. Dieser hohe Anteil an Makrophagen könnte mitunter eine Erklärung für die teils widersprüchlichen IL-6 Spiegel sein, da diese als wichtige Quelle von IL-6 angesehen werden (Gubernatorova et al., 2018).

Generell zeigen diese teilweise widersprüchlichen Daten, dass bezüglich IL-6 noch viele Fragen offen sind und weitere Forschung nötig sein wird, um klarer zu verstehen, welche Rolle IL-6 in der Pathogenese von Allergie und Asthma einnimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten keinen Zusammenhang zwischen Allergikern ohne erfolgter Immuntherapie und erhöhten IL-6 Spiegeln feststellen. Ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen einer allergenspezifischen Immuntherapie und erhöhten IL-6 Spiegeln gibt, bleibt unklar.

4.4 Korrelation mit Klinik

Medizinische Forschung sollte auch immer einen Bezug zum Patienten und seinen tatsächlichen Beschwerden herstellen. Im Folgenden wurde versucht diesem Anspruch gerecht zu werden. So wurden Korrelationen zwischen klinischen Daten und den Ergebnissen der zellulären Analyse erstellt, um eventuelle Zusammenhänge hervorzuheben. Als Maßstab des klinischen Befindens der Patienten gilt dabei der RQLQ, Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire, mithilfe dessen man eine standardisierte Messung der klinischen Symptome vornehmen kann (Meltzer, Nathan, Seiner, & Storms, 1997). Der IgE-Wert, der in der Diagnostik allergischer Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt (Ansotegui et al., 2020), wurde ebenfalls auf Zusammenhänge mit zellulären Veränderungen besonders in Bezug auf Th2- und Th9-Zellen in den unteren Atemwegen untersucht, nachdem in PBMCs von atopischen Patienten IgE Level eine starke Korrelation mit IL-9 aufgezeigt werden konnte (Devos et al., 2006). Auch wenn die statistische Power nicht ausreicht, um klinische Outcomes festzumachen, zeigt sich doch eine eindeutige Tendenz, dass IL-9 produzierende Zellen in den unteren Atemwegen sowohl mit dem RQLQ-Score von allergischen Patienten korrelieren als auch mit den Ig-E Level. Auch wenn der Zusammenhang zwischen IL-9 und allergischen Symptomen keine neue Erkenntnis ist (Gu, Wang, & Cao, 2017), so konnten diese Korrelationsmessungen nicht nur vorherige Ergebnisse bestätigen, sondern auch die klinische Relevanz dieser Arbeit unterstreichen. Klinische Zusammenhänge bieten einen Ausgangspunkt für neue Therapieansätze, wie sie bereits in verschiedenster Form bei Th2-Zellen und Th9-Zellen in vitro oder an Mäusen untersucht wurden (Bosnjak, Stelzmueller, Erb, & Epstein, 2011; Shin et al., 2017).

4.5 Zusammenfassung

Insgesamt konnten die Ergebnisse aus dieser Studie die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Th2, Th9 und regulatorischen T-Zellen bestätigen. Th2 und Th9-Zellen scheinen nicht nur systemisch, sondern auch in den unteren Atemwegen eine aktivierende Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankung zu spielen und können durch eine allergenspezifische Immuntherapie moduliert werden. Gegensätzlich verhalten sich die regulatorischen T-Zellen, die einer allergischen Pathogenese entgegenwirken und bei gesunden Probanden und Probanden mit erfolgter Immuntherapie vermehrt vorkommen. Erstmals konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Th9-Zellen in den unteren Atemwegen durch eine AIT moduliert werden können. Diese Ergebnisse konnten gestützt werden durch die Analysen der entsprechenden Zytokine, die sich konkordant zu den ihnen zuordenbaren Zellen verhalten. So sind IL-4, IL-5 und IL-13 sowohl in den unteren Atemwegen als auch systemisch bei Allergikern erhöht und können bei erfolgter Immuntherapie nur noch in geringerem Maße nachgewiesen werden. Dasselbe gilt für die zu den Th9-Zellen assoziierten Zytokine IL-9, während IL-2, IL-10 und IFN- γ sich gegensätzlich dazu verhalten. TGF β , dessen Rolle in der Literatur viel diskutiert wird, erwies sich in den Ergebnissen dieser Arbeit als proinflammatorisch und in Zusammenhang mit Th9-Zellen stehend. Bezüglich der Analyse des Zytokins IL-6 zeigt sich in dieser Arbeit ein mit der Literatur teilweise in Widerspruch stehendes Resultat. So zeigte es sich bei Patienten mit Immuntherapie verstärkt exprimiert im Vergleich zu unbehandelten Probanden, obwohl IL-6 dafür bekannt ist, eine proinflammatorische Rolle in Allergien zu spielen.

Insgesamt konnte diese Arbeit dazu beitragen, ein besseres Verständnis für die molekularen Vorgänge bei allergischen Erkrankungen zu erlangen. Allerdings bleiben noch viele Fragen ungeklärt und es bedarf weiterer Forschungsarbeit, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

4.6 Ausblick

Obwohl die Forschung bis dato vielversprechende Möglichkeiten aufzeigen konnte, liegt noch ein weiter Weg für das exakte Verständnis allergischer Erkrankungen sowie in der Diagnostik und der Therapiebandbreite zur Behandlung von allergischer Rhinitis und Asthma vor uns.

Molekulare Mechanismen sind noch nicht ausreichend erklärt und immer noch liegen teils widersprüchliche Erkenntnisse vor. Des Weiteren besteht noch viel Bedarf in der Erforschung von Biomarkern oder prognostischen Markern für eine bessere und akkuratere Diagnostik (Breiteneder et al., 2019). Genauso sind trotz großer Prävalenz allergischer Erkrankungen in der Bevölkerung die aktuell bestehenden Therapiemöglichkeiten immer noch nicht zufriedenstellend und häufig unzureichend. So gaben über 80% der Patienten Einschränkungen ihrer Lebensqualität an (Walter, Bousquet, Mullol, Scadding, & Virchow, 2007). Daher bleibt oft als letzter Versuch die bisher einzig kausale Therapiemöglichkeit: die allergenspezifische Immuntherapie (Calderon et al., 2012).

Doch auch hier sind noch viele Fragen offen. So sind die Induktionsmechanismen noch nicht ausreichend verstanden, genauso wenig wie der langfristige Erhalt der Allergentoleranz. Ziel ist es die AIT noch standardisierter, sicherer und effektiver zu gestalten (Larsen, Broge, & Jacobi, 2016). Bis heute wird das Outcome einer AIT an real-life-exposure gemessen, die per se nicht gut standardisiert werden kann. Zwar führt eine AIT zu einer signifikanten Besserung der Symptome um 30% sowie zu geringerem Bedarf an Medikation von 38% im Vergleich zu einer Placebogruppe, aber eine vollständige Aufhebung aller Symptome kann damit oft nicht erreicht werden (Dahl et al., 2006). Auch hier hat die Forschung noch einen langen Weg vor sich, dieser Volkskrankheit, die europaweit mehr als 60 Millionen Menschen betrifft, etwas entgegenzusetzen (Papadopoulos et al., 2012).

Mit dieser Arbeit konnte ein Beitrag zum molekularen Verständnis allergischer Erkrankungen geleistet werden sowie die Wirksamkeit der allergenspezifischen Immuntherapie noch einmal hervorgehoben werden,

Diskussion

deren Pathomechanismus und dem Verständnis desselben man einen Schritt näher kommen konnte.

Literaturverzeichnis

- Abul K. Abbas, A. H. L., Shiv Pillai. (2018). Cellular and molecular immunology (9th Edition ed.): Elsevier.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., . . . Akdis, C. A. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 199(11), 1567-1575. doi:10.1084/jem.20032058
- Amin, K., Issa, S. M., Ali, K. M., Aziz, M. I., Hama Amieen, H. M., Bystrom, J., & Janson, C. (2020). Evidence for eosinophil and IL-17 mediated inflammation in allergic rhinitis. *Clinical and Molecular Allergy*, 18(1), 6. doi:10.1186/s12948-020-00117-6
- Angkasekwinai, P. (2019). Th9 Cells in Allergic Disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 19(5), 29. doi:10.1007/s11882-019-0860-8
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., & Romagnani, S. (2009). Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(6), 325-331. doi:10.1038/nrrheum.2009.80
- Ansotegui, I. J., Melioli, G., Canonica, G. W., Caraballo, L., Villa, E., Ebisawa, M., . . . Zuberbier, T. (2020). IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organization Journal*, 13(2), 100080. doi:10.1016/j.waojou.2019.100080
- Baumann, R., Untersmayr, E., Zissler, U. M., Eyerich, S., Adcock, I. M., Brockow, K., . . . Schmidt-Weber, C. B. (2021). Noninvasive and minimally invasive techniques for the diagnosis and management of allergic diseases. *Allergy*, 76(4), 1010-1023. doi: 10.1111/all.14645
- Belda, J., Leigh, R., Parameswaran, K., O'Byrne, P. M., Sears, M. R., & Hargreave, F. E. (2000). Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(2 Pt 1), 475-478. doi:10.1164/ajrccm.161.2.9903097

- Bellanti, J. A. (1998). Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc*, 19(6), 337-341. doi:10.2500/108854198778612735
- Bergmann KC, H. J., Niemann H. Commission of the Robert Koch Institute. (2016). Current status of allergy prevalence in Germany. Position paper of the Environmental Medicine. *Allergo J Int* 25:6-10. doi:10.1007/s40629-016-0089-1
- Berker, M., Frank, L. J., Geßner, A. L., Grassl, N., Holtermann, A. V., Höppner, S., . . . Woopen, C. M. P. (2017). Allergies – A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm. *Clinical Immunology*, 174, 73-83. doi: 10.1016/j.clim.2016.11.001
- BioLegend. LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/77581_Human_Free_active_Total_TGF_b1_Assay_V03.pdf [aufgerufen am 03.11.2021].
- Bischoff, S. C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol*, 7(2), 93-104. doi:10.1038/nri2018
- Blau, H., Linnane, B., Carzino, R., Tannenbaum, E. L., Skoric, B., Robinson, P. J., . . . Ranganathan, S. C. (2014). Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage in young, non-expectorating cystic fibrosis children. *J Cyst Fibros*, 13(1), 106-110. doi:10.1016/j.jcf.2013.05.013
- Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., . . . Bellier, B. (2016). Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. *The Journal of Immunology*, 197(1), 188-198. doi:10.4049/jimmunol.1501271
- Bosnjak, B., Stelzmueller, B., Erb, K. J., & Epstein, M. M. (2011). Treatment of allergic asthma: Modulation of Th2 cells and their responses. *Respiratory Research*, 12(1), 114. doi:10.1186/1465-9921-12-114
- Bousquet, J., Vignola, A. M., & Demoly, P. (2003). Links between rhinitis and asthma. *Allergy*, 58(8), 691-706. doi:10.1034/j.1398-9995.2003.00105.x
- Breiteneder, H., Diamant, Z., Eiwegger, T., Fokkens, W. J., Traidl-Hoffmann, C., Nadeau, K., . . . Akdis, C. A. (2019). Future research trends in

- understanding the mechanisms underlying allergic diseases for improved patient care. *Allergy*, 74(12), 2293-2311. doi: 10.1111/all.13851
- Brožek, J. L., Bousquet, J., Baena-Cagnani, C. E., Bonini, S., Canonica, G. W., Casale, T. B., . . . Schünemann, H. J. (2010). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 466-476. doi:10.1016/j.jaci.2010.06.047
- Bundesamt, (2019). Daten zu Kosten im Gesundheitswesen: Krankheitskosten nach ausgewählten Diagnosen, Alter und Geschlecht 2015 - Tabelle 4.3.5 - Statistisches Jahrbuch (Destatis) 2019.
- Burks, A. W., Calderon, M. A., Casale, T., Cox, L., Demoly, P., Jutel, M., . . . Akdis, C. A. (2013). Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(5), 1288-1296.e1283. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.049
- Cafone, J., Ruffner, M. A., & Spergel, J. M. (2020). The Role of Eosinophils in Immunotherapy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 20(1), 1. doi:10.1007/s11882-020-0895-x
- Calderon, M. A., Demoly, P., Gerth van Wijk, R., Bousquet, J., Sheikh, A., Frew, A., . . . Papadopoulos, N. (2012). EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clinical and translational allergy*, 2(1), 20. doi:10.1186/2045-7022-2-20
- Calzada, D., Baos, S., Cremades-Jimeno, L., & Cárđaba, B. (2018). Immunological Mechanisms in Allergic Diseases and Allergen Tolerance: The Role of Treg Cells. *Journal of Immunology Research*, 2018, 6012053. doi:10.1155/2018/6012053
- Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., . . . Kaplan, M. H. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 11(6), 527-534. doi:10.1038/ni.1867

- Chaplin, D. D. (2006). 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2 Suppl Mini-Primer), S430-435. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.034
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-j., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12), 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
- Ciprandi, G., Sormani, M. P., Filaci, G., & Fenoglio, D. (2008). Carry-over effect on IFN-gamma production induced by allergen-specific immunotherapy. *International Immunopharmacology*, 8(12), 1622-1625. doi: 10.1016/j.intimp.2008.07.007
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*, 85(1), 36-42. doi: 10.1002/cyto.a.22348
- Cottrez, F., Hurst, S. D., Coffman, R. L., & Groux, H. (2000). T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol*, 165(9), 4848-4853. doi:10.4049/jimmunol.165.9.4848
- Cox, L., Nelson, H., Lockey, R., Calabria, C., Chacko, T., Finegold, I., . . . Wallace, D. (2011). Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *J Allergy Clin Immunol*, 127(1 Suppl), S1-55. doi:10.1016/j.jaci.2010.09.034
- Cox, L., Williams, B., Sicherer, S., Oppenheimer, J., Sher, L., Hamilton, R., & Golden, D. (2008). Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 101(6), 580-592. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60220-7

- Dahl, R., Kapp, A., Colombo, G., de Monchy, J. G. R., Rak, S., Emminger, W., . . . Durham, S. R. (2006). Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(2), 434-440. doi:10.1016/j.jaci.2006.05.003
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., . . . Kuchroo, V. K. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*, 9(12), 1347-1355. doi:10.1038/ni.1677
- Del Prete, G. F., De Carli, M., D'Elisio, M. M., Maestrelli, P., Ricci, M., Fabbri, L., & Romagnani, S. (1993). Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *European Journal of Immunology*, 23(7), 1445-1449. doi: 10.1002/eji.1830230707
- Deo, S. S., Mistry, K. J., Kakade, A. M., & Niphadkar, P. V. (2010). Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India : official organ of Indian Chest Society*, 27(2), 66-71. doi:10.4103/0970-2113.63609
- Devos, S., Cormont, F., Vrtala, S., Hooghe-Peters, E., Pirson, F., & Snick, J. (2006). Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 36(2), 174-182. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02422.x
- Dhami, S., Kakourou, A., Asamoah, F., Agache, I., Lau, S., Jutel, M., . . . Sheikh, A. (2017). Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 72(12), 1825-1848. doi:10.1111/all.13208
- Dhami, S., Nurmatov, U., Arasi, S., Khan, T., Asaria, M., Zaman, H., . . . Sheikh, A. (2017). Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 72(11), 1597-1631. doi:10.1111/all.13201

- Dretzke, J., Meadows, A., Novielli, N., Huissoon, A., Fry-Smith, A., & Meads, C. (2013). Subcutaneous and sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: a systematic review and indirect comparison. *J Allergy Clin Immunol*, 131(5), 1361-1366. doi:10.1016/j.jaci.2013.02.013
- Eckl-Dorna, J., Villazala-Merino, S., Campion, N. J., Byazrova, M., Filatov, A., Kudlay, D., . . . Valenta, R. (2019). Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. *Cells*, 8(9), 994. doi:10.3390/cells8090994
- Elyaman, W., Bassil, R., Bradshaw, E. M., Orent, W., Lahoud, Y., Zhu, B., . . . Khoury, S. J. (2012). Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity*, 36(4), 623-634. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.020
- Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., Volkmann, B., Hagenberg, A., Geldmacher, H., Braun, A., & Krug, N. (2003). Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(6), 1319-1327. doi: 10.1067/mai.2003.1485
- Fahy, J. V., Liu, J., Wong, H., & Boushey, H. A. (1993). Cellular and Biochemical Analysis of Induced Sputum from Asthmatic and from Healthy Subjects. *American Review of Respiratory Disease*, 147(5), 1126-1131. doi:10.1164/ajrccm/147.5.1126
- Fahy, J. V., Wong, H., Liu, J., & Boushey, H. A. (1995). Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 152(1), 53-58. doi:10.1164/ajrccm.152.1.7599862
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., & Neurath, M. F. (2004). Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4⁺CD25⁻ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5149-5153. doi:10.4049/jimmunol.172.9.5149
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330-336. doi:10.1038/ni904

- Frew, A. J. (2010). Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S306-313. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.064
- Fujita, H., Soyka, M. B., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2012). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clinical and translational allergy*, 2(1), 2-2. doi:10.1186/2045-7022-2-2
- Furin, M. J., Norman, P. S., Creticos, P. S., Proud, D., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M., & Naclerio, R. M. (1991). Immunotherapy decreases antigen-induced eosinophil cell migration into the nasal cavity. *J Allergy Clin Immunol*, 88(1), 27-32. doi:10.1016/0091-6749(91)90297-2
- Gauvreau, G. M., Doctor, J., Watson, R. M., Jordana, M., & O'Byrne, P. M. (1996). Effects of inhaled budesonide on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 154(5), 1267-1271. doi:10.1164/ajrccm.154.5.8912734
- Gergen, P. J., & Turkeltaub, P. C. (1992). The association of individual allergen reactivity with respiratory disease in a national sample: data from the second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976-80 (NHANES II). *J Allergy Clin Immunol*, 90(4 Pt 1), 579-588.
- Gibson, P. G., Simpson, J. L., Hankin, R., Powell, H., & Henry, R. L. (2003). Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax*, 58(2), 116-121. doi:10.1136/thorax.58.2.116
- Giovannini-Chami, L., Paquet, A., Sanfiorenzo, C., Pons, N., Cazareth, J., Magnone, V., . . . Barbry, P. (2018). The "one airway, one disease" concept in light of Th2 inflammation. *European Respiratory Journal*, 52(4), 1800437. doi:10.1183/13993003.00437-2018
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention. (2017). Global Initiative for Asthma. Retrieved from https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/04/wmsGINA-2017-main-report-final_V2.pdf
- Głobińska, A., Boonpiyathad, T., Satitsuksanoa, P., Kleuskens, M., van de Veen, W., Sokolowska, M., & Akdis, M. (2018). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 121(3), 306-312. doi:10.1016/j.anai.2018.06.026

- Gounni, A. S., Hamid, Q., Rahman, S. M., Hoeck, J., Yang, J., & Shan, L. (2004). IL-9-Mediated Induction of Eotaxin1/CCL11 in Human Airway Smooth Muscle Cells. *The Journal of Immunology*, 173(4), 2771-2779. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2771
- Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfredi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., . . . Pucillo, C. E. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*, 29(5), 771-781. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.018
- Gu, Z. W., Wang, Y. X., & Cao, Z. W. (2017). Neutralization of interleukin-9 ameliorates symptoms of allergic rhinitis by reducing Th2, Th9, and Th17 responses and increasing the Treg response in a murine model. *Oncotarget*, 8(9), 14314-14324. doi:10.18632/oncotarget.15177
- Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Namakanova, O. A., Zvartsev, R. V., Hidalgo, J., Drutskaya, M. S., . . . Nedospasov, S. A. (2018). Non-redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9(2718). doi:10.3389/fimmu.2018.02718
- Hall, A. O., Beiting, D. P., Tato, C., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C. G., . . . Hunter, C. A. (2012). The cytokines interleukin 27 and interferon-gamma promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity*, 37(3), 511-523. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.014
- Hawrylowicz, C. M., & O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 5(4), 271-283. doi:10.1038/nri1589
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its Receptor: Ten Years Later. *International Reviews of Immunology*, 16(3-4), 249-284. doi:10.3109/08830189809042997
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*, 18(5), 673-683. doi:10.1038/nm.2731
- Holgate, S. T., & Polosa, R. (2006). The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*, 368(9537), 780-793. doi:10.1016/s0140-6736(06)69288-x

- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor *Foxp3*. *Science*, 299(5609), 1057. doi:10.1126/science.1079490
- Iinuma, T., Okamoto, Y., Yamamoto, H., Inamine-Sasaki, A., Ohki, Y., Sakurai, T., . . . Nakayama, T. (2015). Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 114(4), 289-298. doi:10.1016/j.anai.2015.01.013
- Jackson, M. (2003). John Freeman, hay fever and the origins of clinical allergy in Britain, 1900–1950. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 34, 473-490. doi:10.1016/S1369-8486(03)00050-5
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*, 183(11), 7169-7177. doi:10.4049/jimmunol.0901906
- Jartti, T., & Gern, J. E. (2017). Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 895-906. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.003
- Jia, L., Wang, Y., Li, J., Li, S., Zhang, Y., Shen, J., . . . Wu, C. (2017). Detection of IL-9 producing T cells in the PBMCs of allergic asthmatic patients. *BMC immunology*, 18(1), 38-38. doi:10.1186/s12865-017-0220-1
- Jones, C. P., Gregory, L. G., Causton, B., Campbell, G. A., & Lloyd, C. M. (2012). Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J Allergy Clin Immunol*, 129(4), 1000-1010 e1003. doi:10.1016/j.jaci.2011.12.965
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, 30, 531-564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
- Juniper, E. F., & Guyatt, G. H. (1991). Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 21(1), 77-83. doi:10.1111/j.1365-2222.1991.tb00807.x

- Jutel, M., Akdis, M., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2006). Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. *Allergy*, 61(7), 796-807. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01175.x
- Jutel, M., Kosowska, A., & Smolinska, S. (2016). Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future. *Allergy, asthma & immunology research*, 8(3), 191-197. doi:10.4168/aair.2016.8.3.191
- Kamimura, D., Ishihara, K., & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 149, 1-38. doi:10.1007/s10254-003-0012-2
- Kaplan, M. H. (2013). Th9 cells: differentiation and disease. *Immunological reviews*, 252(1), 104-115. doi:10.1111/imr.12028
- Kaplan, M. H., Glosson, N. L., Stritesky, G. L., Yeh, N., Kinzfolg, J., Rohrabough, S. L., . . . Broxmeyer, H. E. (2011). STAT3-dependent IL-21 production from T helper cells regulates hematopoietic progenitor cell homeostasis. *Blood*, 117(23), 6198-6201. doi:10.1182/blood-2011-02-334367
- Kaplan, M. H., Hufford, M. M., & Olson, M. R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*, 15(5), 295-307. doi:10.1038/nri3824
- Kato, Y., Fujisawa, T., Nishimori, H., Katsumata, H., Atsuta, J., Iguchi, K., & Kamiya, H. (2005). Leukotriene D₄ Induces Production of Transforming Growth Factor-β₁ by Eosinophils. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137(suppl 1)(Suppl. 1), 17-20. doi:10.1159/000085427
- Kawayama, T., Matsunaga, K., Kaku, Y., Yamaguchi, K., Kinoshita, T., O'Byrne, P., & Hoshino, T. (2013). Decreased CTLA4⁺ and Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺ Cells in Induced Sputum from Patients with Mild Atopic Asthma. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 62. doi:10.2332/allergolint.12-OA-0492
- Kay, A. B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med*, 344(1), 30-37. doi:10.1056/nejm200101043440106

- Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., & Lloyd, C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*, 202(11), 1539-1547. doi:10.1084/jem.20051166
- Kearley, J., Erjefalt, J. S., Andersson, C., Benjamin, E., Jones, C. P., Robichaud, A., . . . Humbles, A. A. (2011). IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 183(7), 865-875. doi:10.1164/rccm.200909-1462OC
- Kim, M. S., Cho, K.-A., Cho, Y. J., & Woo, S.-Y. (2013). Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models. *Allergy, asthma & immunology research*, 5(4), 197-206. doi:10.4168/aair.2013.5.4.197
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1830-1835. doi:10.1002/eji.201040391
- Kohno, Y., Minoguchi, K., Oda, N., Yokoe, T., Yamashita, N., Sakane, T., & Adachi, M. (1998). Effect of rush immunotherapy on airway inflammation and airway hyperresponsiveness after bronchoprovocation with allergen in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(6), 927-934. doi:10.1016/S0091-6749(98)70330-6
- König, K., Klemens, C., Eder, K., San Nicoló, M., Becker, S., Kramer, M. F., & Gröger, M. (2015). Cytokine profiles in nasal fluid of patients with seasonal or persistent allergic rhinitis. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 11(1), 26. doi:10.1186/s13223-015-0093-x
- Kopf, M., Gros, G. L., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., & Köhler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 362(6417), 245-248. doi:10.1038/362245a0
- Kouzegaran, S., Zamani, M. A., Faridhosseini, R., Rafatpanah, H., Rezaee, A., Yousefzadeh, H., . . . Tehrani, H. (2018). Immunotherapy in Allergic Rhinitis: It's Effect on the Immune System and Clinical Symptoms.

- Open access Macedonian journal of medical sciences, 6(7), 1248-1252. doi:10.3889/oamjms.2018.264
- Kovalszki, A., & Weller, P. F. (2016). Eosinophilia. *Prim Care*, 43(4), 607-617. doi:10.1016/j.pop.2016.07.010
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y., & Aoki, I. (2013). Pathology of asthma. *Frontiers in Microbiology*, 4, 263. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00263>
- Langen, U., Schmitz, R., & Steppuhn, H. (2013). [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 698-706. doi:10.1007/s00103-012-1652-7
- Larsen, J. N., Broge, L., & Jacobi, H. (2016). Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. *Drug Discovery Today*, 21(1), 26-37. doi:10.1016/j.drudis.2015.07.010
- Lewkowich, I. P., Herman, N. S., Schleifer, K. W., Dance, M. P., Chen, B. L., Dienger, K. M., . . . Wills-Karp, M. (2005). CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*, 202(11), 1549-1561. doi:10.1084/jem.20051506
- Leynaert, B., Bousquet, J., Neukirch, C., Liard, R., & Neukirch, F. (1999). Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol*, 104(2 Pt 1), 301-304.
- Leynaert, B., Neukirch, C., Kony, S., Guenegou, A., Bousquet, J., Aubier, M., & Neukirch, F. (2004). Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *J Allergy Clin Immunol*, 113(1), 86-93. doi:10.1016/j.jaci.2003.10.010
- Lin, Y. L., Chen, S. H., & Wang, J. Y. (2016). Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma. *J Mol Med (Berl)*, 94(1), 51-59. doi:10.1007/s00109-015-1325-8
- Linneberg, A., Henrik Nielsen, N., Frolund, L., Madsen, F., Dirksen, A., & Jorgensen, T. (2002). The link between allergic rhinitis and allergic

- asthma: a prospective population-based study. The Copenhagen Allergy Study. *Allergy*, 57(11), 1048-1052.
- Lloyd, C. M., & Hessel, E. M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*, 10(12), 838-848. doi:10.1038/nri2870
- Luttmann, W., Franz, P., Matthys, H., & Virchow, J. C. (1998). Effects of TGF-beta on eosinophil chemotaxis. *Scandinavian journal of immunology*, 47(2), 127-130. doi:10.1046/j.1365-3083.1998.00298.x
- MacGlashan, D., Jr., & Hamilton, R. G. (2016). Parameters determining the efficacy of CD32 to inhibit activation of FcεRI in human basophils. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(4), 1256-1258.e1211. doi:10.1016/j.jaci.2015.10.043
- Matsuzawa, S., Sakashita, K., Kinoshita, T., Ito, S., Yamashita, T., & Koike, K. (2003). IL-9 Enhances the Growth of Human Mast Cell Progenitors Under Stimulation with Stem Cell Factor. *The Journal of Immunology*, 170(7), 3461. doi:10.4049/jimmunol.170.7.3461
- Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2008). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*, 63(11), 1455-1463. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x
- Meltzer, E. O., Nathan, R. A., Seiner, J. C., & Storms, W. (1997). Quality of life and rhinitic symptoms: Results of a nationwide survey with the SF-36 and RQLQ questionnaires. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(6, Part 2), S815-S819. doi: 10.1016/S0091-6749(97)80041-3
- Micossé, C., von Meyenn, L., Steck, O., Kipfer, E., Adam, C., Simillion, C., . . . Schlapbach, C. (2019). Human “T_H⁹” cells are a subpopulation of PPAR-γ⁺ T_H² cells. *Science Immunology*, 4(31), eaat5943. doi:10.1126/sciimmunol.aat5943
- Min, Y.-G. (2010). The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis. *Allergy, asthma & immunology research*, 2(2), 65-76. doi:10.4168/aair.2010.2.2.65

- Moote, W., Kim, H., & Ellis, A. K. (2018). Allergen-specific immunotherapy. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 14(Suppl 2), 53-53. doi:10.1186/s13223-018-0282-5
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7), 2348-2357.
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- Munitz, A., & Foster, P. S. (2012). T(H)9 cells: in front and beyond T(H)2. *J Allergy Clin Immunol*, 129(4), 1011-1013. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.016
- Murdoch, D. R., Morpeth, S. C., Hammitt, L. L., Driscoll, A. J., Watson, N. L., Baggett, H. C., . . . Group, f. t. P. S. (2017). Microscopic Analysis and Quality Assessment of Induced Sputum From Children With Pneumonia in the PERCH Study. *Clinical Infectious Diseases*, 64(suppl_3), S271-S279. doi:10.1093/cid/cix083
- Musiol, S., Alessandrini, F., Jakwerth, C. A., Chaker, A. M., Schneider, E., Guerth, F., . . . Ullmann, J. T. (2021). TGF- β 1 Drives Inflammatory Th Cell But Not Treg Cell Compartment Upon Allergen Exposure. *Frontiers in Immunology*, 12, 763243-763243.
- Neveu, W. A., Allard, J. L., Raymond, D. M., Bourassa, L. M., Burns, S. M., Bunn, J. Y., . . . Rincon, M. (2010). Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respiratory Research*, 11(1), 28. doi:10.1186/1465-9921-11-28
- Nguyen, Q. T., Jang, E., Le, H. T., Kim, S., Kim, D., Dvorina, N., . . . Min, B. (2019). IL-27 targets Foxp3+ Tregs to mediate antiinflammatory functions during experimental allergic airway inflammation. *JCI insight*, 4(2), e123216. doi:10.1172/jci.insight.123216

- Nicolaides, N. C., Holroyd, K. J., Ewart, S. L., Eleff, S. M., Kiser, M. B., Dragwa, C. R., . . . Levitt, R. C. (1997). Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13175-13180. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371819>
- Noelle, R. J., & Nowak, E. C. (2010). Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol*, 10(10), 683-687. doi:10.1038/nri2848
- Nouri-Aria, K. T., Pilette, C., Jacobson, M. R., Watanabe, H., & Durham, S. R. (2005). IL-9 and c-Kit⁺ mast cells in allergic rhinitis during seasonal allergen exposure: Effect of immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(1), 73-79. doi:10.1016/j.jaci.2005.03.011
- Nouri-Aria, K. T., Wachholz, P. A., Francis, J. N., Jacobson, M. R., Walker, S. M., Wilcock, L. K., . . . Durham, S. R. (2004). Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol*, 172(5), 3252-3259. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3252
- O'Byrne, P. M., Inman, M. D., & Parameswaran, K. (2001). The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4), 503-508. doi: 10.1067/mai.2001.119149
- Pajno, G. B., Bernardini, R., Peroni, D., Arasi, S., Martelli, A., Landi, M., . . . Immunology. (2017). Clinical practice recommendations for allergen-specific immunotherapy in children: the Italian consensus report. *Italian Journal of Pediatrics*, 43(1), 13. doi:10.1186/s13052-016-0315-y
- Palomares, O., Akdis, M., Martin-Fontecha, M., & Akdis, C. A. (2017). Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev*, 278(1), 219-236. doi:10.1111/imr.12555
- Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A. K., Akkoc, T., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European Journal of Immunology*, 40(5), 1232-1240. doi: 10.1002/eji.200940045

- Panzner, P., Malkusová, I., Vachová, M., Liška, M., Brodská, P., Růžičková, O., & Malý, M. (2015). Bronchial inflammation in seasonal allergic rhinitis with or without asthma in relation to natural exposure to pollen allergens. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(1), 3-9. doi: 10.1016/j.aller.2013.06.009
- Papadopoulos, N. G., Agache, I., Bavbek, S., Bilo, B. M., Braido, F., Cardona, V., . . . Akdis, C. A. (2012). Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. *Clinical and translational allergy*, 2(1), 21. doi:10.1186/2045-7022-2-21
- Parker, J. M., Oh, C. K., LaForce, C., Miller, S. D., Pearlman, D. S., Le, C., . . . Molino, N. A. (2011). Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. *BMC Pulm Med*, 11, 14. doi:10.1186/1471-2466-11-14
- Parulekar, A. D., Atik, M. A., & Hanania, N. A. (2014). Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 20(1), 60-65. doi:10.1097/mcp.0000000000000005
- Patel PH, A. M., Ullah S. (2019). Bronchoalveolar Lavage . [Updated 2019 Dec 23]. StatPearls [Internet]. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430762/>
- Pavord, I. D., Pizzichini, M. M., Pizzichini, E., & Hargreave, F. E. (1997). The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*, 52(6), 498-501. doi:10.1136/thx.52.6.498
- Pfaar, O., Angier, E., Muraro, A., Halken, S., & Roberts, G. (2020). R1: Algorithms in Allergen Immunotherapy in allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*. doi:10.1111/all.14270
- Pfaar, O., Bachert, C., Bufe, A., Buhl, R., Ebner, C., Eng, P., . . . Schwalfenberg, A. (2014). Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (OGAI), the Swiss Society for

- Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto- Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo J Int*, 23(8), 282-319. doi:10.1007/s40629-014-0032-2
- Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Efthimiadis, A., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1997). Measuring airway inflammation in asthma: Eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(4), 539-544. doi: 10.1016/S0091-6749(97)70082-4
- Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Efthimiadis, A., Hargreave, F. E., & Dolovich, J. (1996). Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*, 9(6), 1174-1180. doi:10.1183/09031936.96.09061174
- Pizzichini, M. M., Kidney, J. C., Wong, B. J., Morris, M. M., Efthimiadis, A., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1996). Effect of salmeterol compared with beclomethasone on allergen-induced asthmatic and inflammatory responses. *Eur Respir J*, 9(3), 449-455. doi:10.1183/09031936.96.09030449
- Platts-Mills, T. A. E. (2001). The Role of Immunoglobulin E in Allergy and Asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(supplement_1), S1-S5. doi:10.1164/ajrccm.164.supplement_1.2103024
- PollenflugInformation. (o.D.). *Pollenflug Information* <https://www.hund.de/de/service/pollenflug-information> [zuletzt aufgerufen am 03.11.2021]. Helmut Hund GmbH.
- Poynter, M. E., & Irvin, C. G. (2016). Interleukin-6 as a biomarker for asthma: hype or is there something else? *Eur Respir J*, 48(4), 979-981. doi:10.1183/13993003.01597-2016

- Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2 Suppl Mini-Primer), S450-456. doi:10.1016/j.jaci.2005.11.016
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G., . . . de Vries, J. E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3730. doi:10.1073/pnas.90.8.3730
- Putheti, P. (2017). Polarizing Cytokines for Human Th9 Cell Differentiation. *Methods Mol Biol*, 1585, 73-82. doi:10.1007/978-1-4939-6877-0_6
- Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R., & Nouri-Aria, K. T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4⁺ CD25⁺ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), 1467-1472, 1472.e1461. doi:10.1016/j.jaci.2008.03.013
- Rak, S., Björnson, A., Håkanson, L., Sörenson, S., & Venge, P. (1991). The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(6), 878-888. doi: 10.1016/0091-6749(91)90244-I
- Ridolo, E., Rogkakou, A., Ventura, M. T., Martignago, I., Incorvaia, C., Di Lorenzo, G., & Passalacqua, G. (2017). How to fit allergen immunotherapy in the elderly. *Clinical and Molecular Allergy*, 15(1), 17. doi:10.1186/s12948-017-0075-2
- Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4⁺T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 461-470. doi:10.1084/jem.185.3.461
- Rincon, M., & Irvin, C. G. (2012). Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1281-1290. doi:10.7150/ijbs.4874
- Roma Thamm, C. P.-M., & Antje Hüther, M. T. (2018). Allergische Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Journal of*

- Health Monitoring, Robert Koch Institute 3 (3).
doi:10.17886/RKI-GBE-2018-075
- Rondón, C., Blanca-López, N., Campo, P., Mayorga, C., Jurado-Escobar, R., Torres, M. J., . . . Blanca, M. (2018). Specific immunotherapy in local allergic rhinitis: A randomized, double-blind placebo-controlled trial with *Phleum pratense* subcutaneous allergen immunotherapy. *Allergy*, 73(4), 905-915. doi: 10.1111/all.13350
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), 775-787. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009
- Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(7), 634-643. doi:10.1038/s41423-019-0220-6
- Scadding, G. W., Eifan, A. O., Lao-Araya, M., Penagos, M., Poon, S. Y., Steveling, E., . . . Durham, S. R. (2015). Effect of grass pollen immunotherapy on clinical and local immune response to nasal allergen challenge. *Allergy*, 70(6), 689-696. doi:10.1111/all.12608
- Schatz, M. (2007). A survey of the burden of allergic rhinitis in the USA. *Allergy*, 62 Suppl 85, 9-16. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01548.x
- Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., . . . Rude, E. (1994). IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol*, 153(9), 3989-3996.
- Schmitt, E., Klein, M., & Bopp, T. (2014). Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol*, 35(2), 61-68. doi:10.1016/j.it.2013.10.004
- Sehra, S., Yao, W., Nguyen, E. T., Glosson-Byers, N. L., Akhtar, N., Zhou, B., & Kaplan, M. H. (2015). TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 136(2), 433-440.e431. doi:10.1016/j.jaci.2015.01.021
- Seumois, G., Chavez, L., Gerasimova, A., Lienhard, M., Omran, N., Kalinke, L., . . . Vijayanand, P. (2014). Epigenomic analysis of primary human T cells reveals enhancers associated with TH2 memory cell differentiation

- and asthma susceptibility. *Nat Immunol*, 15, 777. doi:10.1038/ni.2937
<https://www.nature.com/articles/ni.2937#supplementary-information>
- Seys, S. F., Daenen, M., Dilissen, E., Van Thienen, R., Bullens, D. M. A., Hespel, P., & Dupont, L. J. (2013). Effects of high altitude and cold air exposure on airway inflammation in patients with asthma. *Thorax*, 68(10), 906-913. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-203280
- Shamji, M. H., Kappen, J. H., Akdis, M., Jensen-Jarolim, E., Knol, E. F., Kleine-Tebbe, J., . . . Schmidt-Weber, C. B. (2017). Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*, 72(8), 1156-1173. doi:10.1111/all.13138
- Shimbara, A., Christodoulopoulos, P., Soussi-Gounni, A., Olivenstein, R., Nakamura, Y., Levitt, R. C., . . . Hamid, Q. A. (2000). IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: Increased expression in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(1, Part 1), 108-115. doi: 10.1016/S0091-6749(00)90185-4
- Shin, J. H., Kim, D. H., Kim, B. Y., Kim, S. W., Hwang, S. H., Lee, J., & Kim, S. W. (2017). Anti-Interleukin-9 Antibody Increases the Effect of Allergen-Specific Immunotherapy in Murine Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma & Immunology Research*, 9(3), 237-246. doi:10.4168/aair.2017.9.3.237
- Simpson, L. J., Patel, S., Bhakta, N. R., Choy, D. F., Brightbill, H. D., Ren, X., . . . Ansel, K. M. (2014). A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production. *Nat Immunol*, 15, 1162. doi:10.1038/ni.3026
<https://www.nature.com/articles/ni.3026#supplementary-information>
- Śledzińska, A., Hemmers, S., Mair, F., Gorka, O., Ruland, J., Fairbairn, L., . . . Buch, T. (2013). TGF- β Signalling Is Required for CD4⁺ T Cell Homeostasis But Dispensable for Regulatory T Cell Function. *PLOS Biology*, 11(10), e1001674. doi:10.1371/journal.pbio.1001674
- Spanevello, A., Confalonieri, M., Sulotto, F., Romano, F., Balzano, G., Migliori, G. B., . . . Michetti, G. (2000). Induced sputum cellularity. Reference

- values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*, 162(3 Pt 1), 1172-1174. doi:10.1164/ajrccm.162.3.9908057
- Stassen, M., Schmitt, E., & Bopp, T. (2012). From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1247, 56-68. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06351.x
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., . . . Bopp, T. (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, 33(2), 192-202. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.014
- Sugimoto, N., Suzukawa, M., Nagase, H., Koizumi, Y., Ro, S., Kobayashi, K., . . . Ohta, K. (2018). IL-9 Blockade Suppresses Silica-induced Lung Inflammation and Fibrosis in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 60(2), 232-243. doi:10.1165/rcmb.2017-0287OC
- Takatsu, K., & Nakajima, H. (2008). IL-5 and eosinophilia. *Current opinion in immunology*, 20(3), 288-294. doi: 10.1016/j.coi.2008.04.001
- Takatsuka, S., Yamada, H., Haniuda, K., Saruwatari, H., Ichihashi, M., Renaud, J. C., & Kitamura, D. (2018). IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. *Nat Immunol*, 19(9), 1025-1034. doi:10.1038/s41590-018-0177-0
- Teale, J. M., & Klinman, N. R. (1980). Tolerance as an active process. *Nature*, 288(5789), 385-387. doi:10.1038/288385a0
- Tötsch, M., Guzman, J., Theegarten, D., Schmid, K. W., & Costabel, U. (2007). Bronchoalveoläre Lavage. *Der Pathologe*, 28(5), 346-353. doi:10.1007/s00292-007-0926-6
- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*, 32, 51-82. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120257
- Tyurin, Y. A., Lissovskaya, S. A., Fassahov, R. S., Mustafin, I. G., Shamsutdinov, A. F., Shilova, M. A., & Rizvanov, A. A. (2017). Cytokine Profile of Patients with Allergic Rhinitis Caused by Pollen, Mite, and Microbial Allergen Sensitization. *Journal of Immunology Research*, 2017, 3054217. doi:10.1155/2017/3054217

- Uhm, T. G., Kim, B. S., & Chung, I. Y. (2012). Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy, asthma & immunology research*, 4(2), 68-79. doi:10.4168/air.2012.4.2.68
- Van Parijs, L., & Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, 280(5361), 243-248. doi:10.1126/science.280.5361.243
- Varshney, J., & Varshney, H. (2015). Allergic Rhinitis: an Overview. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 67(2), 143-149. doi:10.1007/s12070-015-0828-5
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., . . . Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9(12), 1341-1346. doi:10.1038/ni.1659
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., . . . Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9(12), 1341-1346. doi:10.1038/ni.1659
- Vercelli, D., Jabara, H. H., Arai, K., & Geha, R. S. (1989). Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(4), 1295. doi:10.1084/jem.169.4.1295
- Vignola, A. M., & Bousquet, J. (2001). Rhinitis and asthma: a continuum of disease? *Clinical & Experimental Allergy*, 31(5), 674-677. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01115.x
- Walker, S., Khan-Wasti, S., Fletcher, M., Cullinan, P., Harris, J., & Sheikh, A. (2007). Seasonal allergic rhinitis is associated with a detrimental effect on examination performance in United Kingdom teenagers: case-control study. *J Allergy Clin Immunol*, 120(2), 381-387. doi:10.1016/j.jaci.2007.03.034

- Walter, C., Bousquet, J., Mullol, J., Scadding, G., & Virchow, J. (2007). A survey of the burden of allergic rhinitis in Europe. *Allergy*, 62 Suppl 85, 17-25. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01549.x
- Wang, J., Homer, R. J., Chen, Q., & Elias, J. A. (2000). Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol*, 165(7), 4051-4061. doi:10.4049/jimmunol.165.7.4051
- Ward, R., Woltmann, G., Wardlaw, A. J., & Pavord, I. D. (1999). Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination. *Clin Exp Allergy*, 29(2), 248-252. doi:10.1046/j.1365-2222.1999.00483.x
- Weißgerber, P. (2013). *Mikrobiologische Diagnostik und Infektiologie. Repetitorium Krankenhaushygiene und hygienebeauftragter Arzt*, 145-182. doi:10.1007/978-3-642-36864-6_8
- Weissler, K. A., & Frischmeyer-Guerrerio, P. A. (2019). Genetic evidence for the role of transforming growth factor- β in atopic phenotypes. *Current opinion in immunology*, 60, 54-62. doi:10.1016/j.coi.2019.05.002
- WHO, (2021). Body Mass Index - BMI <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> [aufgerufen am 08.08.2021].
- Wilhelm, C., Hirota, K., Stieglitz, B., Van Snick, J., Tolaini, M., Lahl, K., . . . Stockinger, B. (2011). An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol*, 12(11), 1071-1077. doi:10.1038/ni.2133
- Wilson, D. R., Irani, A.-M., Walker, S. M., Jacobson, M. R., Mackay, I. S., Schwartz, L. B., & Durham, S. R. (2001). Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clinical & Experimental Allergy*, 31(11), 1705-1713. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01231.x
- World Medical Association (2001). World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(4), 373-374. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/268312>

- Xian, M., Feng, M., Dong, Y., Wei, N., Su, Q., & Li, J. (2020). Changes in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells and Serum Cytokines in Sublingual and Subcutaneous Immunotherapy in Allergic Rhinitis with or without Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 181(1), 71-80. doi:10.1159/000503143
- Yagi, R., Zhu, J., & Paul, W. E. (2011). An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International Immunology*, 23(7), 415-420. doi:10.1093/intimm/dxr029
- Yamasaki, A., Saleh, A., Koussih, L., Muro, S., Halayko, A. J., & Gounni, A. S. (2010). IL-9 induces CCL11 expression via STAT3 signalling in human airway smooth muscle cells. *PLoS One*, 5(2), e9178-e9178. doi:10.1371/journal.pone.0009178
- Yao, W., Tepper, R. S., & Kaplan, M. H. (2011). Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(6), 1357-1360.e1355. doi:10.1016/j.jaci.2011.06.019
- Yokoyama, A., Kohno, N., Fujino, S., Hamada, H., Inoue, Y., Fujioka, S., . . . Hiwada, K. (1995). Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 151(5), 1354-1358. doi:10.1164/ajrccm.151.5.7735584
- Zheng, W.-p., & Flavell, R. A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*, 89(4), 587-596. doi: 0.1016/S0092-8674(00)80240-8
- Zissler, U. M. (2012). Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum. Frankfurt (Main), Univ., Diss., 2012 .
- Zissler, U.M, & Chaker, A. (2016). Allergien und Atemwege: Eine immunologische Schnittstelle. *Deutsches Ärzteblatt*, 113, 31. doi:10.3238/PersPneumo.2016.06.17.07
- Zissler, U. M., Jakwerth, C. A., Guerth, F. M., Pechtold, L., Aguilar-Pimentel, J. A., Dietz, K., . . . Chaker, A. M. (2018). Early IL-10 producing B-cells and coinciding Th/Tr17 shifts during three year grass-pollen AIT. *EBioMedicine*, 36, 475-488. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.016

Zissler, U. M., Jakwerth, C. A., Rothkirch, S., Guerth, F., Weckmann, M., . . .
Chaker, A. M. (2018). Biomatrix for upper and lower airway biomarkers
in patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.*
doi:10.1016/j.jaci.2018.07.027

Publikationen

Musiol, S., Alessandrini, F., Jakwerth, C. A., Chaker, A. M., Schneider, E., Guerth, F., Schnautz, B., Grosch, J., Ghiordanescu, I., Ullmann, J.T., Kau, J., **Plaschke, M.**, Haak, S., Buch, T., Schmidt-Weber, C.B., Zissler, U.M. (2021). TGF- β 1 Drives Inflammatory Th Cell But Not Treg Cell Compartment Upon Allergen Exposure.

Frontiers in Immunology, 12, 763243-763243.

Wang, S.-H., Zissler, U. M., Buettner, M., Heine, S., Heldner, A., Kotz, S., Pechtold, L., Kau, J., **Plaschke, M.**, Ullmann, J.T., Guerth, F., Oelsner, M., Alessandrini, F., Blank, S., Chaker, A.M., Schmidt-Weber, C.B., Jakwerth, C. A. (2021).

An exhausted phenotype of TH2 cells is primed by allergen exposure, but not reinforced by allergen-specific immunotherapy.

Allergy, 76(9), 2827-2839. doi:<https://doi.org/10.1111/all.14896>

Jakwerth, C.A., Chaker, A.M., Guerth, F., Oelsner, M., Pechtold, L., Zur Bonsen, L.S., Ullmann, J.T., Krauss-Etschmann, S., Erb, A., Kau, J., **Plaschke, M.**, Winkler, M., Kurz, A., Kloss, A., Esser-von Bieren, J., Schmidt-Weber, C.B., Zissler, U.M. (2021).

Sputum microRNA-screening reveals Prostaglandin EP3 receptor as selective target in allergen-specific immunotherapy.

Clinical & Experimental Allergy. doi:[10.1111/cea.14013](https://doi.org/10.1111/cea.14013)

Anhang

I. SOP Sputumgewinnung und -prozessierung

Protokoll für Studie _____ Sputum induziert durch _____
 Titel, Vorname, Nachname

SPUTUM INDUZIERUNG

Probanden-Nummer _____

Tag der Prozessierung

Tag Monat Jahr

BASELINE FEV₁-MESSUNG

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Höchster Wert
	FEV ₁ (L)	FEV ₁ (L)	FEV ₁ (L)	FEV ₁ (L)
Pre-Bronchodilator				
Salbutamol				
Post-Bronchodilator				

Berechnen Sie den Abfall des FEV₁ um 10% bzw. 20% in Bezug auf den Höchsten Wert [FEV₁ (L)] nach Verabreichung der 400µg Salbutamol.

Post-Bronchodilator FEV₁ Abfall um 10% . L

Post-Bronchodilator FEV₁ Abfall um 20% . L

SPUTUM INDUKTION

	Konzentration NaCl	FEV ₁ in L	✓ bei Gabe von Salbutamol	Dosis an Salbutamol
Inhalation 1				
Inhalation 2				
Inhalation 3				

Begründung für Abweichungen vom Protokoll:

Dokumentationen von unerwünschten Ereignissen:

Dokumentation von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen:

Protokoll für Studie _____ Sputum aufbereitet durch _____
 Titel, Vorname, Nachname

SPUTUM AUFBEREITUNG

Probanden-Nummer _____

Tag der Prozessierung

Tag Monat Jahr

PRE-PROZESSIERUNG DER SPUTUMPROBE

Gesamtgewicht (Gefäß + Probe) A	Gewicht des leeren Gefäßes (Gefäß) B	Gewicht des Sputums C = (A – B)	
Gramm	Gramm	Gramm	

QUALITÄT DER SPUTUMPROBE

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

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

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

GEWICHT DES SELEKTIERTEN SPUTUMS

GEWICHT DES LEEREN SPU- TUMGEFÄSSE S D	GEWICHT DES GEFÄSSES + SPUTUM E	GEWICHT DES SELEKTIERTE N SPUTUMS F = (E – D)	VOLUMEN AN DTT HINZUGEFÜGT 4 x F	VOLUMEN AN PBS HINZUGEFÜGT 2 x F
Gramm	Gramm	Gramm	mL	mL

FILTRIERTES VOLUMEN

GEWICHT DES LEEREN GEFÄSSES G	GEWICHT GEFÄSS + FILTRAT H	GEWICHT DES FILTRATS I = (H – G)	VOLUMEN DES FILTRATS I
Gramm	Gramm	Gramm	mL

Probanden-Nummer _____

Tag der Prozessierung

Tag

Monat

Jahr

ZELLZÄHLUNG

Zählen Sie die 4 Quadranten in der Neugebauer-Zählkammer.

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

	Leukozyten Zählung pro mL ¹⁾ 10 ⁴ Zellen/mL	Squamöse Zellen ²⁾ %	Lebende Leukozyten ³⁾ %	Gesamt-Leukozyten ⁴⁾ 10 ⁶ Zellen
Durchschnitt				

¹⁾ Leukozyten-Zählung (10⁴ Zellen/mL) = Durchschnitt (Lebende + Tote Leukozyten) x 2 (1:2 Verd. mit Tryp.blau)

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

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

⁴⁾ Gesamt-Leukozyten = [Leukozyten-Zählung (10⁴ Zellen/mL x Volumen des Filtrats (mL))] / 100

RESUSPENSIONSVOLUMEN (X) FÜR ZYTOSPIN

Resuspensions-Volumen : . mL

Berechnung : Gesamt-Leukozyten (10⁶ Zellen) / (0.5 x 10⁶) = Resuspensions-Volumen

Protokoll für Studie _____

SPUTUM ZUSAMMENFASSUNG

Probanden-Nummer _____

Tag der Prozessierung

Tag Monat Jahr

Sputum induziert durch _____

Sputum aufgearbeitet durch _____

SPUTUMPROBEN

Probennahme:			Anzahl	der
Proben				
Lungenfunktionsdaten	<input type="checkbox"/> vorhanden	<input type="checkbox"/> nicht vorhanden		
Induziertes Sputum	<input type="checkbox"/> vorhanden	<input type="checkbox"/> nicht vorhanden		
Überstände	<input type="checkbox"/> vorhanden	<input type="checkbox"/> nicht vorhanden	<input type="text"/>	

Zytospin-Präparate

vorhanden

nicht vorhanden

RNA-Proben

vorhanden

nicht vorhanden

Differentialzellzählung:

___% Makrophagen; ___% Lymphozyten; ___% Neutrophile; ___% Eosinophile; ___% Basophile

Begründung für Abweichung vom Protokoll:

Datum, Unterschrift (Induktion)

Datum, Unterschrift (Aufarbeitung)

Beschriftung der Proben:

- Beschriften Sie bitte die Objektträger folgendermassen:

Studenname _____
SLIDE Nr. 1-4 _____
Patientennummer _____
Datum _____

- Beschriften Sie bitte die Proben mit den Überständen für die Protein-Messung folgendermassen:

Studenname _____
Sputumüberstand

Aliquot Nr. 1-4 Patientennummer _____ Datum _____

- Bitte beschriften Sie die Proben mit den Zellüberständen folgendermassen:

Studienname _____ Zellen in RLT+ β -Merc.EthOH Patientennummer _____ Datum _____

II. mRQLQ

Patientennummer:

Datum:

Mini Rhinitis Quality of Life Questionnaire (deutsche Version)

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

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in dieser Arbeit unterstützt haben und diese ermöglicht haben.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Carsten Schmidt-Weber für die Betreuung meiner Arbeit. Meinem Doktormentor Dr. Adam Chaker danke ich für die Einführung in die Allergologie und die konstruktiven Gespräche beim Erstellen dieser Arbeit.

Besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Ulrich Zissler für die Unterstützung, die Einweisung in die Sputuminduktion und -prozessierung, Hilfe bei der Auswertung und die viele Geduld und Zeit, die er mir gewidmet hat.

Ich bedanke mich bei meiner Mitdotorandin Josephine Kau für die gute Zusammenarbeit. Ferdinand Gürth gebührt großer Dank für seine Unterstützung bei der Auszählung der Zytospins und für die Hilfe im praktischen Teil dieser Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Julia Ullmann für die Hilfe bei der PBMC-Isolierung und Ileana Ghiordanescu für die Hilfe bei der Sputumprozessierung.

Ich möchte mich außerdem bei meinen Eltern bedanken, die mir stets den Rücken für mein Studium und das Erstellen dieser Arbeit freigehalten haben. Großer Dank geht auch an meine Schwestern Anna und Sarah, die mir bei technischen Schwierigkeiten zur Seite standen und stets ein offenes Ohr hatten. Bei Lorenz Oberkofler möchte ich mich für die große Hilfe und Geduld, die mich in all dieser Zeit begleitet haben, besonders bedanken.

Das größte Dankeschön geht an die Probanden, die durch ihre Teilnahme an der Studie diese erst ermöglicht haben.