

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

Der lösliche Rezeptor von IL-33, sST2, in saisonaler allergischer Rhinitis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Lisa Schüller  
(2016)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Martin Wagenmann

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Antje Schuster

Meinen Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Tilgner L, Gaertner-Akerboom M, Scheckenbach K, Wiltfang J, Chaker A, Schipper J, Wagenmann M. Nasal levels of soluble IL-33R ST2 and IL-16 in allergic rhinitis: inverse correlation trends with disease severity. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(10):1134–43.

Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Tilgner L, Scheckenbach K, Wiltfang J, Schipper J, Chaker A, Wagenmann M. Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27(4):266–72.

## Zusammenfassung

*Einleitung:* Die Allergische Rhinitis ist eine Immunglobulin E (IgE)-vermittelte Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut nach Allergenexposition. Primäre Symptome sind Niesen, Juckreiz, Sekretion und Obstruktion. Neben den verschiedenen sekundären Symptomen wie Schlaf- und Konzentrationsstörungen kann die allergische Rhinitis auch mit einer Reihe von Komorbiditäten wie Konjunktivitis, Sinusitis und Asthma einhergehen. Da die weltweite Prävalenz der allergischen Rhinitis in den letzten Jahrzehnten zugenommen hat, sind auch die direkten und indirekten Kosten, die durch diese Erkrankung entstehen, gestiegen.

Für die Pathophysiologie der allergischen Rhinitis spielen Zytokine - besonders die Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 - eine tragende Rolle. Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die von Zellen, in der Regel als Reaktion auf vorhergehende aktivierende Stimuli, gebildet und sezerniert werden können. Sie dienen dann über Zytokinrezeptoren auf den Zielzellen der interzellulären Kommunikation. IL-33 ist ein Zytokin, welches an membrangebundene ST2L-Rezeptoren bindet und vielfältige Wirkungen auf hämatopoetische und nichthämatopoetische Zellen entfalten kann. Unter anderem fördert es die für allergische Reaktionen relevante Th2-Immunantwort. In letzter Zeit gelangte sowohl IL-33 als auch sein löslicher Rezeptor sST2 zunehmend in den Fokus der Untersuchungen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Ziel unserer Studie war es zu untersuchen, ob IL-33 oder sST2 in der saisonalen allergischen Rhinitis unter natürlichen Expositionsbedingungen vermehrt in der Nasenschleimhaut freigesetzt werden.

*Methoden:* Es wurden 15 symptomatische Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis nach natürlicher Allergenexposition innerhalb der Pollenflugsaison im Zeitraum Mai bis Juli 2010 ausgewählt. Außerdem wurden 14 gesunde Kontrollprobanden ohne klinische Beschwerden und ohne Sensibilisierung im Skin-Pricktest ausgewählt. Bei allen Probanden wurden Nasenlavagen durchgeführt. Diese wurden mittels IL-33 und sST2-ELISA untersucht. Zudem wurden Zytokin- und Chemokinprofile in den Nasenlavagen mit auf dem Prinzip der Elektrochemilumineszenz basierenden Assays ermittelt.

*Ergebnisse:* IL-33 konnte weder in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis, noch in denen der gesunden Kontrollprobanden nachgewiesen werden, da sich die Konzentrationen aller Proben unterhalb der Nachweisgrenze des IL-33 ELISA befanden. Es fand sich allerdings eine signifikante Erhöhung des sST2 in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis verglichen mit den Kontrollprobanden. Zudem ergab sich für die sST2-Konzentrationen der Probanden mit allergischer Rhinitis eine negative Korrelation mit den nasalen Beschwerden. Die Zytokin- und Chemokinprofile der Nasenlavagen wiesen überwiegend allergietypische Muster auf.

*Schlussfolgerung und Diskussion:* Dieser Untersuchung zufolge wird sST2 während der Immunreaktion der Nasenschleimhaut bei allergischer Rhinitis vermehrt freigesetzt. Dies deutet darauf hin, dass der IL-33 Signalweg in der Nasenschleimhaut von Heuschnupfenallergikern unter natürlichen Expositionsbedingungen durch den löslichen ST2-Rezeptor reguliert wird. Vorhergehende Studien [1,2] weisen darauf hin, dass bei natürlicher Allergenexposition die systemischen IL-33-Serumkonzentrationen von Heuschnupfenallergikern signifikant über denen der Kontrollen liegen. Für systemisches sST2 finden sich jedoch in einem Großteil der Veröffentlichungen keine signifikanten Unterschiede. Bisher gibt es keine Studien, die die lokalen IL-33- und sST2-Konzentrationen in Nasenlavagen von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis während der natürlichen Allergenexposition näher beleuchten.

Unsere Daten über die lokalen IL-33- und sST2-Konzentrationen der Nasenschleimhaut von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis stützen Ergebnisse aus den Untersuchungen von Kamekura et al. [3], in denen sich immunhistochemisch und mittels RT- und real time PCR eine vermehrte IL-33 und ST2L Expression in Nasenschleimhäuten mit allergischer Rhinitis nachweisen ließen. Zukünftig könnte der IL-33/ST2 Signalweg sich zu einem neuen Ansatzpunkt für Therapiemöglichkeiten der saisonalen allergischen Rhinitis entwickeln. Dafür sind jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ARIA</b>	<i>Allergic rhinitis and its impact on asthma</i>	<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex</i>
<b>BAL</b>	bronchoalveoläre Lavage	<b>MIP</b>	<i>macrophage inflammatory protein</i>
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin	<b>mRNA</b>	<i>massenger ribonucleic acid</i>
<b>BU</b>	<i>biological units</i>	<b>MSD</b>	Meso Scale Discovery
<b>CCD</b>	charge-coupled device	<b>NF</b>	<i>nuclear factor</i>
<b>CCV</b>	<i>calculated concentration coefficient of variation</i>	<b>NaCl</b>	0,9% Natriumchloridlösung
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	<b>OTC</b>	<i>over the counter- Medikamente</i>
<b>CYP450</b>	Cytochrom P450	<b>PBMC</b>	periphere mononukleäre Blutzellen
<b>ECP</b>	eosinophiles kationisches Protein	<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>FEIA</b>	Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay	<b>PID</b>	Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst
<b>IFN</b>	Interferon	<b>qPCR</b>	quantitative Polymerasekettenreaktion
<b>IgE</b>	Immunglobulin E	<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>IL</b>	Interleukin	<b>SIT</b>	spezifische Immuntherapie
<b>IP</b>	<i>interferon-inducible protein</i>	<b>SCIT</b>	subkutane Immuntherapie
<b>ISAAC</b>	Internationale Studie zu Asthma und Allergie in der Kindheit	<b>SLIT</b>	sublinguale Immuntherapie
<b>LCF</b>	<i>leukocyte chemoattractant factor</i>	<b>TARC</b>	<i>thymus and activation regulated chemokine</i>
<b>LLOD</b>	<i>lower limit of detection</i>	<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>
<b>MAP</b>	<i>mitogen-activated protein</i>	<b>VCAM</b>	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
<b>MCP</b>	<i>monocyte chemotactic protein</i>	<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
<b>MDC</b>	<i>macrophage derived chemokine</i>	<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Allergische Rhinitis</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Einteilung .....	2
1.1.3 Symptomatik .....	3
1.1.4 Diagnostik.....	3
1.1.5 Therapie.....	6
1.1.6 Kosten .....	9
<b>1.2 Pathomechanismus</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 T-Lymphozyten.....	11
1.2.2 Th1/Th2 Dichotomie? .....	12
1.2.3 Th17-Lymphozyten.....	13
1.2.4 Regulatorische T-Lymphozyten.....	13
1.2.5 Zytokine .....	15
1.2.6 IL-33: Einordnung und Vorkommen.....	15
1.2.7 ST2 Expression und Effekte von IL-33 .....	16
1.2.8 Der lösliche IL-33-Rezeptor: sST2 .....	18
1.2.9 IL-33 und sST2 im Zusammenhang mit Allergie .....	18
1.2.10 IL-33 und sST2 im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen .....	19
1.2.11 IL-10 und IL-16 im Zusammenhang mit Allergie .....	20
<b>1.3 Fragestellung</b> .....	<b>23</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Studiendesign</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Probanden und Proben</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Probanden .....	25
2.2.2 Proben .....	26
<b>2.3 Material</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Technische Geräte.....	28
2.3.2 Verbrauchsmaterialien .....	28
<b>2.4 Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.4.1 MSD Multispot-Assay Systeme.....	29
2.4.2 ELISA .....	33
2.4.3 Kits/gebrauchsfertige Systeme .....	34
2.4.4 Statistik.....	35
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 Nasale Beschwerden und Gesamtstärke allergischer Beschwerden</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2 Eosinophile Granulozyten im Differentialblutbild</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3 IL-33 und sST2</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 IL-4, IL-5 und IL-13</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5 IL-2, IL-12 und IFN-<math>\gamma</math></b> .....	<b>40</b>
<b>3.6 IL-10, IL-16 und IL-17</b> .....	<b>42</b>
<b>3.7 Chemokine</b> .....	<b>43</b>
<b>3.8 Korrelationen</b> .....	<b>45</b>
3.8.1 Nasale Beschwerden.....	45
3.8.2 sST2.....	46
3.8.3 IL-5 .....	46

3.8.4 IL-16 .....	46
3.8.5 Chemokine .....	46
3.8.6 Eosinophilie .....	47
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 IL-33 und sST2 .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 T-Lymphozyten .....</b>	<b>51</b>
4.2.1 Th2-Zytokine: IL-4, IL-5 und IL-13 .....	51
4.2.2 Th1-Zytokine: IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ .....	56
4.2.3 Das regulatorische T-Zell-Zytokin: IL-10 .....	57
4.2.4 Das Th17-Zytokin: IL-17 .....	58
4.2.5 Ausblick: T-Lymphozyten .....	59
<b>4.3 IL-16 .....</b>	<b>60</b>
<b>4.4 Chemokine .....</b>	<b>61</b>
<b>4.5 Methodik.....</b>	<b>68</b>
<b>4.6 Abschlussbemerkungen .....</b>	<b>69</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>94</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>.....</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>.....</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergische Rhinitis

### 1.1.1 Epidemiologie

Zur Epidemiologie der Allergischen Rhinitis trägt eine Studie aus dem Jahr 2001 bei. Bauchau und Durham untersuchten die Prävalenz der allergischen Rhinitis in sechs europäischen Ländern. Sie ermittelten eine durchschnittliche Prävalenz von 22,7%. Die Prävalenz in Deutschland lag bei 20,6%. Die Prävalenzen atopischer Erkrankungen und somit auch der allergischen Rhinitis sind jedoch nicht konstant. In einer internationalen Studie zu Asthma und Allergie in der Kindheit (ISAAC) konnte festgestellt werden, dass weltweit große Unterschiede in der Prävalenz allergischer Erkrankungen herrschen [4-6]. In den USA wurde die Prävalenz der saisonalen allergischen Rhinitis 1994 auf über 40% der Sechsjährigen geschätzt. Aktuelle Statistiken aus den USA geben an, dass 2009, 10% der unter 17-jährigen und 8% der 18- bis 64-jährigen in den vorausgegangenen zwölf Monaten die Diagnose Heuschnupfen gestellt bekommen haben [7,8]. In Japan ergab eine Schätzung 1990, dass 32,7% der 18- bis 22-jährigen an saisonaler allergischer Rhinitis litten. In Europa lag in den 90er Jahren die Streuung der geschätzten Prävalenzen in verschiedenen Altersgruppen zwischen 3% und 22,7% [9]. In zahlreichen Studien weltweit wurde zudem festgestellt, dass die Prävalenz der allergischen Rhinitis steigt [10-12].

Mit der Frage nach Unterschieden zwischen der ost- und westdeutschen Bevölkerung wurde die Prävalenz atopischer Erkrankungen und deren Entwicklung in den 90er Jahren in Deutschland besonders umfangreich untersucht. In Leipzig lag die Prävalenz von Heuschnupfen unter neun- bis elfjährigen Kindern 1991/92 noch bei 2,3%. Vier Jahre später betrug sie 5,1% [13].

In Sachsen- Anhalt konnte bei fünf bis 14 Jahre alten Schulkindern zwischen 1992 und 1999 zwar kein kohortenadjustierter Prävalenzanstieg für Heuschnupfen ermittelt werden, jedoch zeichnete sich ein positiver Trend bezüglich allgemeiner Pollenallergien und diagnostiziertem Heuschnupfen ab [14]. Angewendet auf Münster, zeigte sich in der internationalen Studie zu Asthma und Allergie in der Kindheit (ISAAC) eine deutliche Zunahme der Prävalenz der allergischen Rhinitis und eine ansteigende Tendenz der Lebenszeitprävalenz für Heuschnupfen [15].

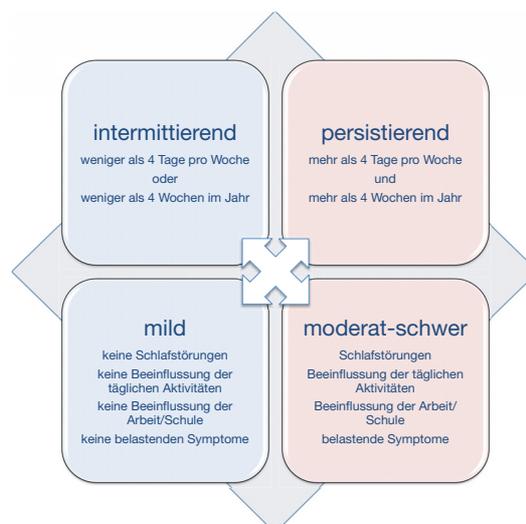
Auch bei Erwachsenen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Prävalenz. Zwischen 1990 und 1992 zeigte eine Studie an deutschen Erwachsenen zwischen 20 und

44 Jahren, dass in Hamburg 24,4% der Männer und 24,3% der Frauen an Heuschnupfen litten, während in Erfurt nur 11,4% der Männer und 13% der Frauen betroffen waren [16]. 1991/92 zeigte eine Untersuchung <45-jähriger Erwachsener, dass klinische und serologische Allergien gegen Aeroallergene in Westdeutschland signifikant häufiger waren als in Ostdeutschland [17].

### 1.1.2 Einteilung

Lange galt eine klinische Unterteilung der allergischen Rhinitis in einerseits saisonale allergische Rhinitis bei Sensibilisierung gegen Pollen und andererseits perenniale allergische Rhinitis bei Sensibilisierung gegen ganzjährig vorhandene Aeroallergene, zum Beispiel durch Hausstaubmilben oder Schimmelpilzsporen. Eine von diesen beiden zu unterscheidende Form der allergischen Rhinitis ist die berufsbedingte Form als Folge einer Allergenexposition am Arbeitsplatz.

2001 stellte die Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Workshop Gruppe in Zusammenarbeit mit der World Health Organisation (WHO) eine neue Einteilung der Allergischen Rhinitis vor (Abb. 1). Die allergische Rhinitis wurde je nach Anhalten der Symptome in eine intermittierende (weniger als vier Tage pro Woche bzw. weniger als vier Wochen pro Jahr) oder persistierende Form (mehr als vier Tage pro Woche bzw. mehr als vier Wochen pro Jahr) unterteilt. Des Weiteren unterschied man zwischen milder oder moderat-schwerer allergischer Rhinitis unter Berücksichtigung der Schwere der Symptome und der Beeinträchtigung des täglichen Lebens durch die Beschwerden [9].



**Abb. 1: Klassifikation der allergischen Rhinitis** entsprechend der ARIA-Einteilung 2001 [9,18]

### **1.1.3 Symptomatik**

Klinisch äußert sich die allergische Rhinitis primär durch Niesen, Juckreiz, anteriore und posteriore Rhinorrhoe sowie nasale Obstruktion. Die Symptome treten bereits Minuten nach Allergenkontakt, in der so genannten Frühphase, auf. Vier bis zehn Stunden später kommt es zu einer erneuten, so genannten Spätphasesymptomatik. Sekundär können auch Symptome wie unter anderem Husten, Halsschmerzen, Dyspnoe oder Schlaf- und Konzentrationsstörungen auftreten. Zudem kann die Allergische Rhinitis mit ernstzunehmenden Komorbiditäten und Komplikationen einhergehen. Bei einem Großteil der Patienten geht die allergische Rhinitis mit einer allergischen Konjunktivitis einher. Das Fortschreiten der Allergie kann, im Rahmen des so genannten Etagenwechsels, zu allergischem Asthma bronchiale führen. Über 80% der Asthmapatienten haben allergische Rhinitiden, und bei knapp über 20% der Patienten mit allergischer Rhinitis besteht ein Asthma [19,20]. Dabei sind besonders die perenniale allergische Rhinitis und die kombinierte Form mit saisonaler Steigerung der Symptomatik mit Asthma assoziiert [21-24]. Der Zusammenhang zwischen allergischer Rhinitis und Asthma wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Therapie der allergischen Rhinitis eine Besserung des Asthmas zur Folge haben kann [25-29]. Des Weiteren besteht das Risiko eine chronische Sinusitis zu entwickeln [30].

Trotz der bekannten und umfangreichen Komplikationen wird die allergische Rhinitis immer noch nicht ausreichend wahrgenommen. So ergab eine Studie aus Kopenhagen im Jahr 2000, dass 32% der Patienten mit allergischer Rhinitis undiagnostiziert und 83% der Patienten mit moderat-schwerer allergischer Rhinitis untertherapiert waren [31].

### **1.1.4 Diagnostik**

Den ersten und wichtigsten Schritt in der Diagnostik der Allergischen Rhinitis bildet die sorgfältige Anamnese. Besonders wichtig ist es, herauszufinden, welcher Art die Symptome sind, wie häufig und wie stark sie ausgeprägt sind. In der Regel hängt die Symptomatik von bestimmten Orten und Zeiten bzw. Jahreszeiten ab. Aus diesem Grund lohnt es sich, das Wohn- und Arbeitsumfeld des Betroffenen gründlich zu analysieren und jahreszeitliche Zusammenhänge zu hinterfragen. Des Weiteren sind die Familienanamnese zu erheben und Diagnosen aus dem Bereich des atopischen Formenkreises gezielt zu erfragen. Die Anamnese fördert auf diese Weise oft erste Hinweise auf relevante Allergene zutage. Kreuzreaktionen zwischen den spezifischen Immunglobulin E (IgE)-Antikörpern

gegen Pollen- und Nahrungsmittelantigene können zu bestimmten Nahrungsmittelallergien (orales Allergiesyndrom) führen, die ebenfalls Rückschlüsse auf das ursprüngliche Allergen zulassen. Außerdem sollten auch die Komorbiditäten und mögliche Komplikationen der allergischen Rhinitis ermittelt werden.

In der HNO-ärztlichen Spiegeluntersuchung fallen die entzündlich gerötete Nasenschleimhaut und die blassen bis lividen, ödematös geschwollenen Nasenmuscheln auf. Die Nasenschleimhaut ist zumeist von einem wässrigen Sekret überzogen.

Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer Allergie lassen sich mit Hilfe von Allergietests die potentiell ausschlaggebenden Allergene weiter eingrenzen. Diese Tests beinhalten Hauttests, den nasalen Provokationstest und die spezifische IgE-Bestimmung aus dem Serum. In der Allergiediagnostik für Aeroallergene wird als Hauttest überwiegend der Skin-Prick-Test angewendet. Tropfen kommerziell erhältlicher, standardisierter Allergienlösungen werden in nummerierter Reihenfolge auf die Haut des Unterarmes oder des Rückens aufgebracht. Als Positivkontrolle dient ein Tropfen Histaminlösung, als Negativkontrolle ein Tropfen physiologischer Kochsalzlösung. Daraufhin werden alle Tropfen gleichmäßig mit einer Prick-Nadel oder einer Lanzette durchstochen und somit in die Dermis eingebracht. Besteht eine Sensibilisierung gegen ein eingebrachtes Allergen, entwickelt sich eine Quaddel mit begleitendem Erythem. Nach 20 Minuten wird der Test abgelesen. Dafür werden die Durchmesser der Hautreaktionen in Form von Quaddeln und begleitenden Erythemen vermessen. Zur Auswertung des Skin-Prick-Tests werden die Durchmesser von Quaddeln (und Erythem) gemessen und mit den Durchmessern der Histamin-Hautreaktionen verglichen. [32,33]

Um die klinische Relevanz der im Skin-Prick-Test nachgewiesenen Sensibilisierungen einschätzen zu können, wird ein nasaler Provokationstest durchgeführt. In diesem Test wird Allergen nasal verabreicht. Um unvorhersehbar starke allergische Reaktionen zu vermeiden, ist es wichtig, zuvor Kontraindikationen wie zum Beispiel die Einnahme von  $\beta$ -Blockern und ACE-Hemmern zu erfragen und ggf. den Versuch zu verschieben. Außerdem muss die antiallergische Medikation vor dem Test abgesetzt werden. Dabei ist der medikationsfreie Zeitraum abhängig vom Medikament. Der nasale Provokationstest beinhaltet die rhinomanometrische Messung des Luft-Volumenstroms (*Flow*) durch ein Nasenloch und die Einordnung der durch das verabreichte Allergen hervorgerufenen Symptome in einen Symptomscore. Dieser Symptomscore umfasst Sekretion, Niesreiz und Fernsymptome (z. B. Tränenfluss, Juckreiz, Urtikaria, Husten, Luftnot). Initial wird durch eine beidseitige *Flow*bestimmung die besser durchgängige Nasenseite ermittelt. Diese Nasenseite

weist einen höheren *Flow* auf als die andere Seite und wird dann während des gesamten Tests zur *Flow*bestimmung verwendet. In die Nasenseite werden zwei Sprühstöße des allergenfreien Lösungsmittels (Natriumchloridlösung) mit Hilfe eines Spray-Applikators verabreicht. Bei jeder Applikation ist zu beachten, dass der Patient tief inspiriert, bevor die Sprühstöße gegeben werden, um das Vordringen des Sprüh-Aerosols in die Bronchien und damit eine potentielle bronchiale Reaktion zu vermeiden. Nach zehn Minuten wird der *Flow* gemessen. Hat dieser im Vergleich zum Ausgangswert um weniger als 20% abgenommen, so wird der Versuch fortgeführt. Zwei niedrig dosierte Sprühstöße (z.B. 5000 BU = *biological units*) des zu testenden Allergens werden in die gleiche Nasenseite appliziert. Während der darauf folgenden zehn Minuten werden die für den Symptomscore relevanten Symptome erfasst. Anschließend wird erneut der *Flow* gemessen. Bei einer *Flow*reduktion von mehr als 40% oder einem Symptomscore von mehr als drei Punkten gilt der Test als positiv und wird beendet. Auch eine *Flow*reduktion von über 20% in Kombination mit einem Symptomscore von mehr als zwei Punkten entspricht einem positiven Ergebnis und führt zur Beendigung des Versuchs. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, wird mit einer höher dosierten Applikation (z.B. 10 000 BU) von zwei Sprühstößen desselben Allergens fortgefahren. Ist nach zehn Minuten immer noch keine positive Reaktion aufgetreten, kann noch ein letztes Mal mit einer Höchstdosis provoziert werden. Treten auch dabei keine relevanten Symptome oder *Flow*reduktionen auf, gilt die Reaktion als negativ und der Test wird beendet [34].

Klinisch relevant ist eine Sensibilisierung im Hauttest, wenn das entsprechende Allergen die Beschwerdesymptomatik erklärt und im nasalen Provokationstest eine positive Reaktion auslöst. Das bedeutet im Falle eines negativen Ergebnisses in der nasalen Provokation, dass eine stumme Sensibilisierung vorliegt und weiter nach klinisch relevanten Sensibilisierungen gesucht werden muss.

Die serologische Bestimmung des Gesamt-IgE und des (allergen-)spezifischen IgE gehören zu den am weitesten verbreiteten Untersuchungen der *in vitro*-Diagnostik allergischer Soforttyp-Reaktionen. Dabei steht das spezifische IgE bei der Bestätigung der im Hauttest identifizierten Allergene im Vordergrund. Diese Untersuchungen basieren auf der Messung zuvor gebildeter Antigen-Antikörper-Komplexe, wobei die bindenden Antikörper aus dem Serum des Patienten stammen. Die auf dem Markt erhältlichen Untersuchungssysteme unterscheiden sich in den verwendeten Antigenen und Detektionsprinzipien (z.B. FEIA (Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay)) [35]. Klinische Relevanz liegt vor, wenn die laborchemischen Ergebnisse den Ergebnissen aus Anamnese und nasaler Provokation ent-

sprechen.

### **1.1.5 Therapie**

Die Therapie der allergischen Rhinitis fußt auf drei Säulen: der Allergenkarenz, der medikamentösen Therapie und der spezifischen Immuntherapie.

Die erste Maßnahme des Vorgehens gegen allergische Erkrankungen sollte immer die Allergenkarenz sein. Die Allergenexposition zu vermeiden oder zu reduzieren, kann eine spürbare Besserung der Beschwerden bewirken. Besteht eine allergische Rhinitis mit einer Sensibilisierung gegen Pollen, ist es jedoch schwer, sich dem Allergen ausreichend zu entziehen. Der Pollenflug wird in Deutschland durch die „Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst PID“ erfasst. In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Wetterdienst werden Vorhersagen des Fluges der sieben allergologisch wichtigsten Blütenpollen: Hasel, Erle, Birke, Süßgräser, Roggen, Beifuß und Ambrosia, erstellt [36]. Der Beginn einer Pollenflugsaison ist abhängig von Jahreszeit und Witterung. Tägliche Pollenflugvorhersagen erleichtern es den Betroffenen, vorsorgende Maßnahmen zu ergreifen. Lange Aufenthalte im Freien und pollenassoziierte kreuzreaktive Nahrungsmittel sollten während der Hauptsaison vermieden werden. Zusätzlich ist es sinnvoll, vor dem Schlafengehen die Haare zu waschen und die Urlaubsplanung auf pollenarme Regionen mit Hochgebirgs- oder Meeresklima auszurichten. Diese Maßnahmen alleine reichen jedoch nur in seltenen Fällen, um eine relevante Minderung der Symptome zu erzielen.

Die medikamentöse Therapie der allergischen Rhinitis zielt als zweite Säule der Therapie auf die Verminderung der allergischen Symptome der Patienten ab. Sie basiert im Wesentlichen auf der Applikation bzw. Einnahme von topischen bzw. systemischen Antihistaminika (H1-Rezeptorantagonisten) und topischen, intranasalen Glukokortikosteroiden. Auch intranasale  $\alpha$ - Sympathomimetika, intranasale Chromoglycinsäuren und Leukotrienantagonisten werden eingesetzt. Welches Medikament verordnet wird, hängt von der Symptomstärke und den klinisch relevanten Allergenen ab. Auch Lebensumstände und Begleiterkrankungen des Patienten müssen berücksichtigt werden.

Antihistaminika sind kompetitive Histamin(H1)-Rezeptorantagonisten und werden in Antihistaminika der ersten und der zweiten Generation unterteilt. Die Hemmung der Histaminwirkung auf sensible Nervenendigungen der Schleimhaut mindert Nies- und Juckreiz. Die Hemmung der Kontraktion glatter Muskulatur, der Vasodilatation und der Permeabilitätserhöhung der Gefäße wirken besonders lindernd auf die Rhinorrhoe und für

kurze Zeit auch auf die Obstruktion. Allerdings sind die Antihistaminika der ersten Generation lipophile und dadurch gut ZNS-gängige Substanzen, was eine Sedierung zur Folge hat. Des Weiteren wirken sie nicht spezifisch antihistaminerg, sondern auch anticholinerg und antiserotoninerg, was einerseits einen antiemetischen Effekt begründet, andererseits aber zu Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit, Akkomodationsstörungen (cave: Engwinkelglaukom) und Miktionsstörungen (cave: Prostataadenom) führen kann. Antihistaminika der zweiten Generation werden nach Aufnahme schnell zu hydrophilen Stoffwechselprodukten umgebaut, weshalb sie fast keine sedierende Wirkung besitzen. Die spezifischere Bindung an H<sub>1</sub>- Rezeptoren erklärt, dass kaum noch anticholinerge Nebenwirkungen zu erwarten sind. Da ein Großteil der Antihistaminika der zweiten Generation hepatisch über CYP450 3A verstoffwechselt wird, ist es wichtig, vor oraler Gabe potentielle Interaktionen mit anderen Medikamenten zu berücksichtigen und Leberschäden auszuschließen, um eine Kumulation zu vermeiden.

Glukokortikoide binden an intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren. Diese Rezeptoren fungieren als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und beeinflussen vielfältig die Genexpression und intrazelluläre Signalkaskaden. Glukokortikoide besitzen eine dämpfende Wirkung auf das Immunsystem. Sie senken unter anderem die erhöhte Kapillarpermeabilität und hemmen die Phospholipase A<sub>2</sub>, wodurch weniger Leukotriene und Prostaglandine gebildet werden können. Da auch die Expression anderer proinflammatorischer Proteine (z.B. Zytokine, Chemokine) gehemmt wird, vermindert sich auch der Einstrom von Entzündungszellen. Im Gegensatz zu Antihistaminika und  $\alpha$ - Rezeptoragonisten setzt die Wirkung der Glukokortikoide nicht sofort ein. Mit einer deutlichen Besserung der Beschwerden kann erst nach einigen Tagen gerechnet werden. Aufgrund der komplexen Nebenwirkungen auf den gesamten Stoffwechsel bei systemischer Anwendung (Depression, Osteoporose, Steroiddiabetes, Cushing-Syndrom etc.) ist die topische Gabe der systemischen vorzuziehen. Die Bioverfügbarkeit moderner topischer Glukokortikoide ist sehr gering, weshalb bei hoher Konzentration am Wirkort kaum mit systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden muss. Wichtigste Voraussetzung dafür ist die korrekte Applikation. Lokalen Nebenwirkungen kann mit regelmäßiger Nasenschleimhautpflege (Nasensalbe, Kochsalzspülung) vorgebeugt werden. Die topischen Glukokortikoide sind sehr wirkungsvoll gegen die nasale Obstruktion sowie gegen Niesreiz, Juckreiz und Rhinorrhoe.

Die dritte Säule der Therapie stellt die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) dar, auch als Hyposensibilisierung bekannt. Umfangreiche Untersuchungen der

vergangenen Jahrzehnte weisen die Wirksamkeit der SIT gegen allergische Rhinitis nach [37-39]. Ziel dieses kausalen Therapieansatzes ist es, eine langanhaltende Toleranz gegen die eingesetzten Allergene hervorzurufen. In 60-75% der Fälle kommt es bei Heuschnupfen- und Milbenallergikern nach einer spezifischen Immuntherapie zu einer deutlichen Besserung.

Besteht eine klinisch relevante Sensibilisierung gegen ein Allergen, bei dem eine ausreichende Karenz nicht möglich ist, so kann dieses dem Patienten in aufsteigender Menge subkutan injiziert werden (Subkutane Immuntherapie: SCIT). Die in den Oberarm zu verabreichenden Injektionen finden in regelmäßigen Abständen (je nach Präparat und Exposition bzw. Saison) statt, bis die individuelle Erhaltungsdosis des Patienten erreicht ist. Voraussetzung für die SCIT ist, dass ein wirksamer, industriell hergestellter Extrakt zur Verfügung steht. Nach der Injektion muss der Patient 30 Minuten unter ärztlicher Überwachung bleiben, um ein mögliches Auftreten von schweren bis potentiell lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen erkennen und behandeln zu können. Die gesamte Therapie dauert drei Jahre. Auf immunologischer Ebene modifiziert diese Art der Immuntherapie sowohl die allergenabhängigen T-Zell-Antworten (Aktivierung regulatorischer T-Zellen, Verminderung der Th2-Antwort, verstärkte gegenregulatorische Th1-Antwort) als auch die Immunglobulinproduktion (vermehrte IgG4-Produktion, Hemmung des Anstiegs der IgE-Produktion). Die Aktivität der Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten wird gehemmt [40].

In den letzten Jahren etabliert sich zunehmend auch die sublinguale Immuntherapie (SLIT). Hervorzuheben ist diese besonders als Therapiealternative der allergischen Rhinitis gegen Pollenallergene, da zugrunde liegende wissenschaftliche Studien ihre Wirksamkeit ausreichend bestätigen. Die sublinguale Applikation birgt ein geringeres Risiko systemischer anaphylaktischer Reaktionen [40,41].

Welche dieser Verfahren zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden, ist letztlich individuell abzuwägen und bedarf einer umfangreichen Erfahrung mit beiden Verfahren seitens des behandelnden Arztes.

Spontane Besserungen der Symptomatik sind zwar besonders mit steigendem Lebensalter möglich, jedoch kann eine persistierende allergische Rhinitis ohne kausale Therapie auf Dauer auch eine ständige konservative Therapie notwendig machen.

### **1.1.6 Kosten**

Die durch die allergische Rhinitis und ihre Folgen entstehenden Kosten werden in direkte und versteckt direkte Behandlungskosten sowie indirekte Kosten unterteilt.

In den USA haben sich die Behandlungskosten für die allergische Rhinitis innerhalb von fünf Jahren von 6,1 Milliarden US-Dollar im Jahre 2000 auf 11,2 Milliarden US-Dollar im Jahre 2005 nahezu verdoppelt. Mehr als die Hälfte dieser Kosten ergaben sich aus Medikamentenverordnungen. Die Kosten für OTC Medikamente wurden dabei nicht berücksichtigt und beliefen sich 2008 auf geschätzte 1,175-1,5 Milliarden US-Dollar [42,43].

Versteckt direkte Kosten setzen sich aus den Diagnostik- und Behandlungskosten für Komorbiditäten zusammen, die sich aus allergischer Rhinitis ergeben können. Dazu zählen neben den Behandlungskosten von Konjunktivitiden, Sinusitiden und Asthma auch die Kosten für bildgebende Nasennebenhöhlen-Untersuchungen und Notfallbehandlungen. Leiden Asthmapatienten an allergischer Rhinitis, so verdoppeln sich, einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2004 zufolge, die jährliche Inanspruchnahme medizinischer Ressourcen und die jährlichen Kosten nahezu, verglichen mit Asthmapatienten ohne allergische Rhinitiden [44]. Berücksichtigt man zum Beispiel, dass bis zu 85,7% der Asthmatiker und bis zu 65,7% der Patienten mit chronischer Sinusitis an allergischer Rhinitis leiden [45], lässt sich erahnen, dass die versteckt direkten Kosten ebenfalls in Milliardenhöhe liegen.

Indirekte Kosten ergeben sich aus den anfallenden Arbeitsunfähigkeitszeiten und Produktivitätsverlusten der Betroffenen. Über ein Viertel der 1200 befragten Allgemeinmediziner mit allergischer Rhinitis aus insgesamt acht Ländern gaben an, dass sie in einer Arbeitswoche im Durchschnitt sechs Stunden Arbeitszeit verlieren, wenn sie unter den Symptomen der allergischen Rhinitis leiden. Die übrigen Ärzte sahen sich zumindest in ihrer Effektivität eingeschränkt [46]. Eine andere Umfrage aus den Jahren 2001/2002 ergab, dass 55% von 8267 befragten US-amerikanischen Arbeitnehmern (freiwillige Teilnahme) pro Jahr an über 50 Tagen an Symptomen der allergischen Rhinitis litten, wobei sie im Mittel 2,3 Stunden des betroffenen Arbeitstages unproduktiv verbrachten und pro Jahr für durchschnittlich 3,6 Tage ganz von der Arbeit fern bleiben mussten. So war die allergische Rhinitis für Produktivitätsausfälle von 593US\$ pro Arbeitnehmer jährlich verantwortlich [47].

## 1.2 Pathomechanismus

Bei der allergischen Rhinitis handelt es sich um eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I (Soforttyp) nach Coombs und Gell. Sie wird durch Inhalationsallergene hervorgerufen.

Tritt das Allergen erstmals durch das Epithel des Respirationstrakts hindurch, gelangt es in Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen. Zu diesen gehören dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Im Rahmen der Sensibilisierung spielen dendritische Zellen eine tragende Rolle. Noch inaktive dendritische Zellen der Epidermis von Haut und Schleimhäuten sind sogenannte Langerhans Zellen. Das Allergen wird von den dendritischen Zellen aufgenommen und in seine Bestandteile zerlegt. Diese Bestandteile werden dann in drainierenden Lymphknoten über MHC(-II)-Moleküle den dort angesiedelten naiven T-Zellen präsentiert. Besitzen T-Zellen einen passenden Rezeptor für den präsentierten Allergenbestandteil, können sie unter der Voraussetzung entsprechender kostimulatorischer Signale zu Th2-Zellen aktiviert werden. Auch die Antigenpräsentation durch Langerhans Zellen führt überwiegend zu einer Th2-Antwort [48]. Th2-Zellen setzen vermehrt IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 frei. Das ausgeschüttete IL-4 verstärkt die Aktivierung und Differenzierung weiterer Th2-Zellen, IL-5 fördert die Differenzierung, das Überleben und die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und IL-9 verstärkt die Mastzellendifferenzierung.

Außerdem führen komplexe Interaktionen zwischen den differenzierten Th2-Zellen und B-Zellen, die Allergenbestandteile präsentieren, zu einem so genannten IgE-Switch. Dabei wird das über den MHC-II-Komplex auf der B-Zelloberfläche präsentierte Antigen des Allergens vom T-Zellrezeptor erkannt. Der CD40-Ligand der T-Zelloberfläche interagiert gleichzeitig mit CD40 Oberflächenantigen der B-Zelloberfläche. Als kostimulatorische Signale, die den IgE-Switch herbeiführen, dienen die Zytokine IL-4 und IL-13. Die B-Zellen produzieren daraufhin spezifisches IgE gegen das Allergen. Die Neigung zur übermäßigen IgE-Produktion ist vor allem von genetischen und Umweltfaktoren abhängig. Das allergen-spezifische IgE bindet an hochaffine Fcε-Rezeptoren I (FcεRI) auf Mastzellen, basophilen und aktivierten eosinophilen Granulozyten.

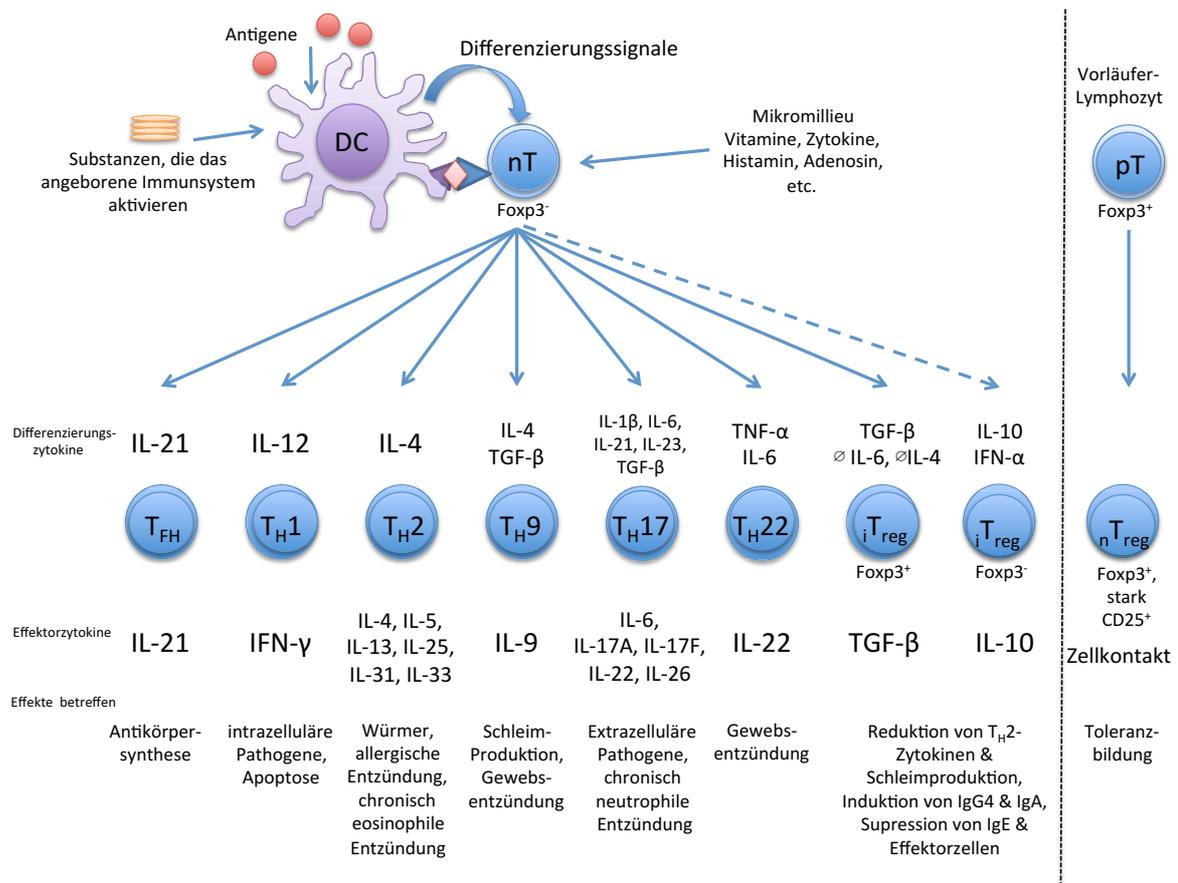
Nach erneutem Allergenkontakt mit der Nasenschleimhaut bildet sich nun innerhalb von Minuten die sogenannte Frühphase aus. Die Allergene binden an die rezeptorgebundenen IgE-Moleküle. Es kommt zu einer Quervernetzung [*crosslinking*] der

IgE-Moleküle und damit zur Aktivierung der FcεRI, wodurch die gewebeständigen, FcεRI-tragenden Mastzellen beginnen, inflammatorische Botenstoffe freizusetzen. Dazu gehören Histamin, Leukotriene und Prostaglandine, welche Symptome, wie Rhinorrhoe, Nasenjucken, Niesreiz und Nasenatmungsbehinderung hervorrufen. Die Sekretion und Obstruktion der Nase werden besonders durch die vasoaktiven Wirkungen der Botenstoffe (u.a. Histamin und Prostaglandin D<sub>2</sub>) gefördert [49,50]. Diese Botenstoffe führen zum Austritt von Plasma aus den lokalen Blutgefäßen. Mit dem Plasma treten plasmatische inflammatorische Enzyme in das Nasenschleimhautgewebe ein, die die Entzündungsreaktion weiter fördern können. Die glanduläre Sekretion wird einerseits direkt durch cholinerge Agonisten, andererseits durch reflektorische Stimulation gefördert. Juck- und Niesreiz werden hauptsächlich durch die Reizung der epithelialen Nervenendigungen hervorgerufen. Auch hier spielt das Histamin eine tragende Rolle.

Zusätzlich werden Zytokine und Chemokine freigesetzt, die zirkulierende Th2-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen rekrutieren. Die Mastzellen und die basophilen Granulozyten regen die aktivierten B-Zellen vor Ort in ihrer IgE-Produktion weiter an, indem sie CD40L exprimieren und IL-4 sezernieren. Im Verlauf von fünf bis zwölf Stunden entwickelt sich die Spätreaktion, in Form einer individuell unterschiedlich stark ausgeprägten Entzündung der Nasenschleimhaut. Die durch die freigesetzten Zytokine und Chemokine rekrutierten Immunzellen strömen nun in großer Zahl in das bereits geschädigte Gewebe ein. Die darunter befindlichen Granulozyten bewirken durch das Ausschütten von toxischen Proteinen und freien Radikalen aus ihren Granula eine weitere Gewebeschädigung. Da die eingewanderten Immunzellen auch symptom erzeugende Mediatoren freisetzen, kommt es zu einer erneuten Symptomatik ohne einen erneuten Allergenkontakt, der so genannten Spätphase.

### **1.2.1 T-Lymphozyten**

In der Gruppe der T-Lymphozyten wird zwischen den CD4<sup>+</sup> und den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten unterschieden. Naive CD4<sup>+</sup> T-Vorläuferzellen sind je nach präsentem Antigen und umgebenem Zytokinmilieu in der Lage sich zu spezifischen T-Helfer-Lymphozyten (u.a. Th1, Th2, Th9, Th17, Th22) oder regulatorischen T-Lymphozyten zu differenzieren (Abb. 2).



**Abb. 2: CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten – links:** Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (DC) im Zusammenspiel mit weiteren umgebenden Faktoren induziert in nativen T-Zellen (nT) die Differenzierung zu follikulären T-Zellen ( $T_{FH}$ ),  $Th_1$ ,  $Th_2$ ,  $Th_9$ ,  $Th_{17}$ ,  $Th_{22}$  und induzierbaren regulatorischen T-Zellen ( $iT_{reg}$ ). Diese T-Zellen können unterschiedliche Entzündungsreaktionen induzieren bzw. dämpfen. Die Effekte werden durch ihre jeweiligen Zytokinprofile, umgebende Chemokine und Interaktionen mit anderen Zellen vermittelt.

**rechts:** Die Reifung natürlicher regulatorischer T-Zellen findet im Thymus statt. (pT: Präkursor- T-Lymphozyt;  $nT_{reg}$ : natürlicher regulatorischer T-Lymphozyt)

Modifiziert nach:

1. Akdis M, BLASER K, Akdis C. T Regulatory Cells in Allergy. Karger Publishers; 2006. p. 159–173.
2. Weaver C, Harrington L, Mangan P, Gavrieli M. ScienceDirect.com - Immunity - Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. Immunity. 2006.
3. Tato CM, O'Shea JJ. Immunology: what does it mean to be just 17? Nature. 2006 May 11;441(7090):166–168.
4. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. Current Opinion in Immunology. 2006 Jun.;18(3):349–356.
5. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Current Opinion in Immunology. 2007 Dec;19(6):652–7.
6. PhD MAM, PhD SB, PhD RC, MD TE, PhD HFM, PhD EG, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: Receptors, functions, and roles in diseases. J. Allergy Clin. Immunol. Elsevier Ltd; 2011 Mar. 1;127(3):701–721.e70.
7. Wisniewski JA, Borish L. Novel cytokines and cytokine-producing T cells in allergic disorders. aap. 2011 Mar. 1;32(2):83–94.
8. Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and Allergy. Allergol. Int. 2008;57(2):121–34.
9. Wong MT, Ye JJ, Alonso MN, Landrigan A, Cheung RK, Engleman E, et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-12. Immunol. Cell Biol. Nature Publishing Group; 2010 Apr 27;88(6): 624–31.
10. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγ. Nat. Immunol. Nature Publishing Group; 2008 May 4;9(6):641–9.
11. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-α and IL-10 Induce the Differentiation of Human Type 1 T Regulatory Cells. The Journal of Immunology. 2001.

## 1.2.2 Th1/Th2 Dichotomie?

Jede Untergruppe der Th-Lymphozyten besitzt ein charakteristisches Zytokinspektrum und kann dann in Wechselwirkung mit den Zellen der Umgebung eine eigene Immunantwort mit speziellen Entzündungsmechanismen triggern. Th1-Lymphozyten produzieren IFN-γ und hemmen dadurch die Ausbreitung intrazellulärer Erreger sowie die Ausbildung einer Th2- oder Th17-Immunantwort. Th2-Lymphozyten sezernieren IL-4, IL-5, IL-9 und

IL-13, die der Abwehr von Wurminfektionen dienen und allergische sowie chronisch eosinophile Entzündungsreaktionen fördern. Gleichzeitig wirkt das IL-4 einer Th1- und Th17-Immunreaktion entgegen. Aus dem Pathomechanismus der allergischen Rhinitis geht hervor, dass die Th2-Lymphozyten in der allergischen Entzündung eine wichtige Rolle spielen. So lassen sich in allergisch entzündeter Nasenschleimhaut vorwiegend CD4<sup>+</sup> Lymphozyten mit Th2-Zellen entsprechendem Zytokinmuster nachweisen [51,52]. Seit einigen Jahren sind weitere Zytokine bekannt, die von Th2-Lymphozyten produziert werden können: IL-25 und IL-31 [53-55].

Obwohl über Jahrzehnte die Meinung weit verbreitet war, dass entweder Th1- oder Th2-Lymphozyten und deren Mediatoren eine Immunantwort bestimmen, kennt man heute ein weitaus größeres Spektrum an CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten. Umfangreiche Erkenntnisse über Th17-Lymphozyten und Treg-Lymphozyten tragen zu neuen Ansichten bei, die auch die allergische Reaktion betreffen [56-59].

### **1.2.3 Th17-Lymphozyten**

Schon vor über zehn Jahren wurde entdeckt, dass es IL-17 produzierende Zellen gibt, die weder den Th1- noch den Th2-Lymphozyten zuzuordnen waren [60]. IL-17A (IL-17) wird hauptsächlich von Th17-Lymphozyten freigesetzt. Des Weiteren sind sie eine Quelle von IL-17F und IL-22. IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das sowohl die Granulopoese induzieren als auch das Überleben neutrophiler Granulozyten und die Akkumulation von Atemwegsmakrophagen während allergischer Atemwegsentzündungen fördern kann [61-63]. Außerdem regt es die Produktion des CXC-Chemokins IL-8 und damit die Neutrophilenrekrutierung an [64,65]. Die Rolle von IL-17 im Zusammenhang mit allergischer Rhinitis ist bisher nicht eindeutig geklärt. In einer Reihe von Untersuchungen fanden Ciprandi et al. heraus, dass die IL-17-Serumwerte und die Anzahl der CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T-Zellen bei Birkenpollenallergikern erhöht sind und sogar mit der Stärke der allergischen Beschwerden zu korrelieren scheinen [66-70]. In anderen Studien an Patienten mit allergischer Rhinitis fanden sich hingegen keine signifikant erhöhten IL-17-Konzentrationen [71,72].

### **1.2.4 Regulatorische T-Lymphozyten**

Regulatorische T-Lymphozyten (Treg) sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die im Thymus reifen und 5-10% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines gesunden Menschen ausmachen. Treg-Zellen sind ein essentieller Bestandteil der immunologischen Toleranzbildung und verhindern

somit die Entwicklung von Autoimmunität. Sie sind charakterisiert durch die konstitutive Expression des *forkhead family* Transkriptionsfaktors Foxp3 und können ihre Effekte über Zell-zu-Zell-Kontakte vermitteln. Auf diesem Weg können sie beispielsweise die Degranulation von Mastzellen hemmen [73-75]. Treg-Zellen supprimieren auch dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, B-Zellen und NK- oder NKT-Zellen [76-79].

Neben diesen natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg) existieren induzierbare regulatorische T-Zellen (iTreg), die ihre Wirkungen im Wesentlichen über Zytokine vermitteln. Zu deren bisher bekanntesten Vertretern gehören die induzierbaren Treg-Zellen vom Typ 1 (Tr1). Diese sind Foxp3<sup>-</sup>, können jedoch *in vitro* transient Foxp3 exprimieren, [80] und setzen hauptsächlich IL-10 frei, welches einen supprimierenden Effekt auf Immunzellen hat. Unter anderem hemmt es die Zytokin- und Chemokinproduktion durch Makrophagen und Monozyten [81-83] und wirkt indirekt supprimierend auf T-Zell-Immunantworten [84]. T-Zell-Immunantworten werden auch direkt durch IL-10 beeinflusst, da es ihre Proliferation und die Sekretion von IL-2, TNF- $\alpha$  und IL-5 hemmt [85-88].

Bisherige Untersuchungen ergaben, dass das Gleichgewicht zwischen Th2- und Tr1-Zellen bei der Entwicklung oder Rückbildung von Allergien eine wichtige Rolle einzunehmen scheint [89]. Man fand außerdem heraus, dass die allergenspezifischen IL-10 sezernierenden regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit persistierender allergischer Rhinitis vermindert sind, obwohl Anzahl und Funktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen nicht verändert sind [73]. *In vitro* lässt der supprimierende Effekt der allergenspezifischen regulatorischen T-Zellen von Heuschnupfenallergikern, aber nicht von Hausstaubmilbenallergikern, während der Saison nach [90,91].

Im Rahmen der spezifischen Immuntherapie vermindern regulatorische T-Zellen nicht nur die Th2-Zellantwort, sondern dämpfen auch andere Immunzellreaktionen wie zum Beispiel die von Mastzellen. Außerdem induzieren sie die Bildung von IgG4 [75,92-94].

Nach der spezifischen Immuntherapie gegen Gräserpollen finden sich vermehrt IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut. Des Weiteren steigt die Anzahl der Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in der Nasenschleimhaut. Die Anzahl der Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen korreliert dabei mit der klinischen Effizienz der Therapie, was wiederum die Annahme bestätigt, dass die allergenspezifische Toleranz durch regulatorische T-Zellen induziert wird [95,96].

### 1.2.5 Zytokine

Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die von vielen Zellarten, in der Regel als Reaktion auf vorhergehende aktivierende Stimuli, gebildet und sezerniert werden können. Über Zytokinrezeptoren können sie dann sowohl lokal auf eine Nachbarzelle (parakrin) oder die Ursprungszelle (autokrin), als auch systemisch zum Beispiel auf Zellen des Knochenmarks (endokrin) wirken. Die Reichweite ihrer Wirkung hängt davon ab wie viel Zytokin freigesetzt wird, wie stabil das Zytokin ist und ob es ungerichtet oder über eine immunologische Synapse an eine Zelle abgegeben wird.

Besonders zwischen den Zellen des Immunsystems spielen Zytokine eine große Rolle. So vermitteln sie zusammen mit membrangebundenen Effektormolekülen die T-Zellfunktionen. Im Rahmen einer allergischen Reaktion werden vorrangig Th2-Zellen aktiviert. Das von ihnen produzierte IL-5 regt eine vermehrte Produktion von eosinophilen Granulozyten an, welche wesentlich zur Spätphase beitragen.

### 1.2.6 IL-33: Einordnung und Vorkommen

IL-33 ist ein Mitglied der IL-1-Zytokinfamilie. Durch seine stimulierende Wirkung auf die Ausschüttung von Th2-assoziierten Zytokinen und Immunglobulinen unterscheidet es sich grundsätzlich von den beiden Interleukinen IL-1 $\beta$  und IL-18, die ebenfalls der IL-1 Familie angehören und zu denen IL-33 die größten Strukturhomologien aufweist. Das IL-33 Gen ist auf Chromosom 9p24.1 lokalisiert. Ein Großteil der Gene der IL-1-Zytokinfamilienmitglieder finden sich, ausgenommen des IL-18 Gens, auf Chromosom 2 [97-99].

Initial schien es, als würde proIL-33 (30kDa/30ku) *in vitro* durch Caspase-1 gespalten und erst danach mit der atomaren Masse von 18kDa(/18ku) in seiner aktiven Form vorliegen [99,100]. Auch IL-1 $\beta$  und IL-18 werden durch Caspase-1 gespalten und aktiviert [101]. Allerdings ist inzwischen mehrfach belegt worden, dass IL-33 zum einen in seiner ungespaltenen Form freigesetzt wird und zum anderen auch das ungespaltene IL-33 biologische Aktivität am ST2-Rezeptor besitzt. Caspase-1 scheint somit keine physiologische Rolle in der Prozessierung von IL-33 zu spielen. Allerdings wurde gezeigt, dass die Apoptose-assoziierten Caspasen-3 und -7 in der Lage sind, IL-33 zu inaktivieren. Aus nekrotischen Zellen wird IL-33 ungespalten freigesetzt. Daraus lässt sich schließen, dass IL-33 als proinflammatorisches Gefahrensignal während eines pathologischen Zellschadens freigesetzt wird. Im Gegensatz dazu wird es während eines physiologischen Zelltods durch die Caspasen-3 und -7 inaktiviert [102-106]. Wird IL-33 im Rahmen einer

Entzündung freigesetzt, so scheint seine Bioaktivität nach Spaltung durch ebenfalls freigesetzte neutrophile Proteasen wie der neutrophilen Elastase und Cathepsin G gesteigert zu sein [107].

Ungespaltene IL-33 kann sowohl extrazellulär als proinflammatorisches Zytokin, als auch nukleär als transkriptionsregulierender Faktor vorliegen. Letzterer findet sich vor allem in menschlichen Endothel- und Epithelzellen. Ihm wird eine transkriptionshemmende Wirkung zugeschrieben [108-111].

In arteriellen und bronchialen glatten Muskelzellen, sowie in Epithelzellen der unteren Atemwege ist IL-33 mRNA stetig vorzufinden. Außerdem können sowohl pulmonale und dermale Fibroblasten als auch Keratinozyten durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zur Transkription der IL-33 Gene angeregt werden. Auch aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen sind in der Lage, in geringem Umfang IL-33 mRNA zu erstellen [99]. Des Weiteren können Fibroblasten nach biomechanischer Stimulation IL-33 synthetisieren [112,113].

### **1.2.7 ST2 Expression und Effekte von IL-33**

ST2 wird vor allem auf Mastzellen und Th2-Zellen exprimiert und ist hoch homolog zu den ligandenbindenden Untereinheiten IL-1R1 und IL-18R $\alpha$  der IL-1- und IL-18-Rezeptor-Komplexe. Bindet IL-33 an ST2-Rezeptoren, so heterodimerisieren diese mit dem IL-1R *accessory protein* [114-117]. Zellen, die ST2 exprimieren, werden in Anwesenheit von IL-33 über NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen aktiviert [99,117-119].

Obwohl bereits seit 1995 bekannt war, dass nicht IL-1, sondern ein anderes eigenständiges Protein als Ligand für den ST2-Rezeptor dient, wurde IL-33 erst 2005 explizit als ST2-Ligand beschrieben [99,120,121].

Schon relativ lange ist die bedeutende Rolle des ST2-Rezeptors und damit auch seines bis 2005 noch unbekanntem Liganden in der Th2-Immunantwort der murinen Lungenschleimhaut bekannt [122]. *In vitro* polarisierte murine Th2-Zellen steigern nach Inkubation mit IL-33 die Ausschüttung der Th2-assoziierten Zytokine IL-5 und IL-13, während entsprechend behandelte Th1-Zellen weniger IFN- $\gamma$  ausschütten. *In vivo* steigen nach der Behandlung von Mäusen mit IL-33 die Bildung und Ausschüttung der Th2-assoziierten Zytokine sowie das Serum IgE. Hinzu kommen Splenomegalie, Blut-Eosinophilie und Becherzellhyperplasie der oberen Atemwege und des Dünndarms [99,116]. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch IL-33 Exposition zu IL-5 produzierenden T-Zellen polarisiert. *In vivo* zeigt sich, dass IL-33 die IL-4-unabhängige Entwicklung allergen-induzierter Atemwegsentzündungen fördert [123]. IL-33 führt in humanen, Th2-polarisierten T-Zellen zu

antigenabhängiger und -unabhängiger Produktion von IL-5, IL-13 und auch IFN- $\gamma$ , weshalb eine die Th1-Antwort fördernde Wirkung nicht komplett ausgeschlossen werden kann [124]. Allerdings wirkt sowohl murines als auch humanes IL-33 nur auf Th2-Zellen chemotaktisch, nicht auf Th1-Zellen [125]. Versuche an Mäusezelllinien haben gezeigt, dass für die Th1-Immunantwort wichtige Rezeptoren, wie Interleukin-1 Rezeptor Typ I und Toll-like Rezeptor-4, durch ST2 inhibiert werden [126,127].

Dendritische Zellen produzieren ebenfalls ST2. Werden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-33-aktivierten dendritischen Zellen inkubiert, so beginnen sie mit der Bildung und Freisetzung von IL-5 und IL-13. IFN- $\gamma$  und IL-4 werden nicht produziert. *In vivo* aktiviert IL-33 dendritische Zellen während der Antigenpräsentation und fördert darüber die Th2-vermittelte Immunreaktion in allergisch-entzündlichen Lungenerkrankungen [128,129].

Auch die Wirkungen von IL-33 auf Mastzellen wurden bereits näher untersucht. Murine Mastzellen weisen, unabhängig von der Bindung von IgE an den hochaffinen Rezeptor Fc $\epsilon$ RI, eine gesteigerte Produktion von IL-13 und anderen proinflammatorischen Mediatoren auf. Auf die Mastzelldegranulation scheint IL-33 jedoch keinen Einfluss zu haben [130,131]. Einen positiven Einfluss hat IL-33 auch auf Überleben, Reifung und Adhäsion humaner Mastzellen. Außerdem stimuliert IL-33 die IL-8- und IL-13-Produktion humaner Mastzellen ebenfalls IgE-Fc $\epsilon$ RI-unabhängig [132,133].

IL-33 fördert die Überlebens- und Adhäsionsfähigkeit von eosinophilen Granulozyten. Des Weiteren induziert es die Produktion von IL-8 und eosinophilem Superoxid-Anion sowie die Eosinophiledegranulation. In seinen Effekten auf eosinophile Granulozyten ist IL-33 dabei ähnlich wirksam wie IL-5 [134,135].

Des Weiteren aktiviert IL-33 basophile Granulozyten. Diese setzen nach Stimulation mit IL-33 vermehrt IL-4 und IL-13 frei und verstärken die IgE-vermittelte Degranulation. Basophile Granulozyten, deren Fc $\epsilon$ -Rezeptoren bereits aktiviert sind, zeigen unter Einwirkung von IL-33 zusätzlich eine gesteigerte Expression von IL-8 und Leukotrien C4 [136].

Verschiedene nicht-hämatopoetische Zellen sind ebenfalls im Stande ST2 zu exprimieren. Besonders interessant ist zum Beispiel, dass IL-33 auf Endothelzellen angiogenesefördernd und permeabilitätssteigernd wirkt. Endo- und Epithelzellen werden durch IL-33 angeregt IL-8 auszuschütten [137,138].

### **1.2.8 Der lösliche IL-33-Rezeptor: sST2**

Neben dem membrangebundenen ST2L [139] als Zelloberflächenrezeptor für IL-33 existieren drei weitere Isoformen: der lösliche IL-33-Rezeptor sST2 sowie ST2V [140,141] und ST2LV, zwei Varianten des ST2-Proteins. ST2LV wurde bisher nur am ST2-Genprodukt von Hühnern beschrieben [142]. Durch alternatives Splicen [143] und das Nutzen von unterschiedlichen Promotorregionen im Bereich des 5'-Endes des ST2-Gens [144] wird entweder sST2 oder ST2L produziert.

Der lösliche ST2-Rezeptor wird von aktivierten Th2-Zell-Klonen freigesetzt [145]. Auch Mastzellen und basophile Granulozyten sind in der Lage sST2 zu produzieren [136,146]. Freigesetztes sST2 kann - kompetitiv zu seiner membrangebundenen Form ST2L - IL-33 binden. Dadurch wird die ST2L vermittelte IL-33-Wirkung abgemildert. Eosinophilen-dominierte Entzündungsreaktionen der Atemwege sowie die IL-4- und IL-5-Produktion werden abgeschwächt [118,122,147,148]. Demnach reguliert sST2 im negativen Sinne die IL-33- mediierte Th2- vermittelte Entzündungsreaktionen.

### **1.2.9 IL-33 und sST2 im Zusammenhang mit Allergie**

Die oben aufgeführten Funktionen von IL-33 weisen darauf hin, dass IL-33 zur Entwicklung von Erkrankungen des atopischen Formenkreis beiträgt. Zu diesen Erkrankungen zählen Asthma bronchiale, atopische Dermatitis und allergische Rhinitis. Die Untersuchung endobronchialer Biopsieproben von Asthmapatienten und gesunden Kontrollpersonen ergab eine gesteigerte immunhistochemische Anfärbarkeit von IL-33 in Bronchialepithelien asthmatischer Patienten. Des Weiteren zeigte sich eine positive Korrelation der Anfärbarkeit mit den klinischen Beschwerden [149,150]. Im Falle der akuten Exazerbation eines Asthma bronchiale kommt es zu einer signifikanten Zunahme der sST2-Serumspiegel [151]. IL-33-Serumspiegel von Patienten mit atopischer Dermatitis liegen signifikant über denen von gesunden Kontrollprobanden [152]. Allerdings sind die sST2-Serumspiegel in Patienten mit atopischer Dermatitis nicht signifikant höher oder niedriger als die von gesunden Kontrollpersonen oder Asthmatikern im anfallsfreien Intervall [146]. Diesen Untersuchungen zufolge, könnte auch bei der allergischen Rhinitis ein lokaler Konzentrationsanstieg von IL-33 zu finden sein.

Serumuntersuchungen von Patienten mit allergischer Rhinitis sind in ihren Ergebnissen uneinheitlich. Eine Erhöhung der IL-33-Serumspiegel im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen wurde in Japan im Zeitraum von Mai bis Juni 2006 bei Patienten beobachtet, die mit Heuschnupfen auf japanische Zedernpollen reagierten [1]. Glück et al.

konnten diese Ergebnisse anhand von Patienten mit Gras- und Birkenpollenallergie bestätigen [153]. In einer Untersuchung japanischer Patienten mit Zedernpollenallergie aus dem Jahr 2009 ließ sich dahingegen in den Seren kein IL-33 detektieren [154].

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2010 fanden sich in Serumproben von Birkenpollenallergikern während einer Birkenpollensaison erhöhte sST2-Werte [155]. Demgegenüber steht die bereits erwähnte Veröffentlichung von Glück et al. aus dem Jahr 2012. Zwischen den ST2-Serumkonzentrationen der Patienten mit allergischer Rhinitis und den Kontrollprobanden bestanden keine signifikanten Unterschiede [153].

Erste Untersuchungen der lokalen Konzentrationen von IL-33 und ST2 in der Nasenschleimhaut ergaben, dass sowohl die IL-33 als auch die ST2L mRNA in Schleimhäuten mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht sind [3]. Außerdem wurde ein Anstieg der IL-33-Konzentrationen in Nasensekreten von Japanern mit Zedernpollenallergie in der Allergiesaison gemessen [154]. Haenuki et al. untersuchten immunfluoreszenzmikroskopisch die nukleäre IL-33 Expression in der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis verglichen mit gesunden Kontrollprobanden. Die nukleäre IL-33 Expression war bei den Kontrollprobanden signifikant erhöht. Zusätzlich stellten sie fest, dass während der Pollensaison die nasale IL-33 mRNA Expression der Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht war. Unterstützt von Untersuchungen am Maus-Modell kamen sie zu dem Schluss, dass nukleäres IL-33 im Rahmen der allergischen Entzündung in den extrazellulären Raum freigesetzt wird [156].

Unsere Arbeitsgruppe veröffentlichte zu diesem Thema gleichzeitig mit dieser Studie eine nasale Provokationsstudie. In dieser zeigte sich im Anschluss an die nasale Provokation ein zweigipfelter Verlauf der sST2-Mengen in den Nasensekreten der Probanden mit allergischer Rhinitis. Sowohl nach zehn Minuten, als auch nach fünf und verstärkt nach 24 Stunden kam es zu signifikanten Anstiegen der sST2-Mengen. Im Gegensatz dazu führten Kontrollprovokationen mit allergenfreier Verdünnungslösung nicht zu signifikanten Veränderungen der sST2-Mengen.

Bislang gibt es keine weiteren Studien, die die lokalen IL-33- und sST2-Konzentrationen auf der Nasenschleimhaut während saisonaler allergischer Rhinitis nach natürlicher Allergenexposition näher beleuchten.

### **1.2.10 IL-33 und sST2 im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen**

IL-33 und sST2 werden auch in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen gebracht. So sind Veränderungen der lokalen und zum Teil auch der systemischen IL-33

Freisetzung zum Beispiel in aktiver rheumatoider Arthritis und in Colitis ulcerosa beschrieben worden [157,158]. Für diese beiden Erkrankungen existieren zudem Untersuchungen bezüglich der systemischen sST2-Konzentrationen. Patienten mit rheumatoider Arthritis weisen erhöhte sST2-Serumspiegel auf [159]. Für die Colitis ulcerosa wird sST2 ebenfalls als Aktivitätsmarker diskutiert [157,160].

Außerdem scheint IL-33 unter anderem auch vielfältige protektive Auswirkungen auf Arteriosklerose, Adipositas und Herzhypertrophie zu haben [161,162]. Gleichzeitig erlauben Veränderungen der sST2-Serumspiegel Aussagen zur Prognose von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz [163] oder akuter Dyspnoe bei erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion [163,164].

## **1.2.11 IL-10 und IL-16 im Zusammenhang mit Allergie**

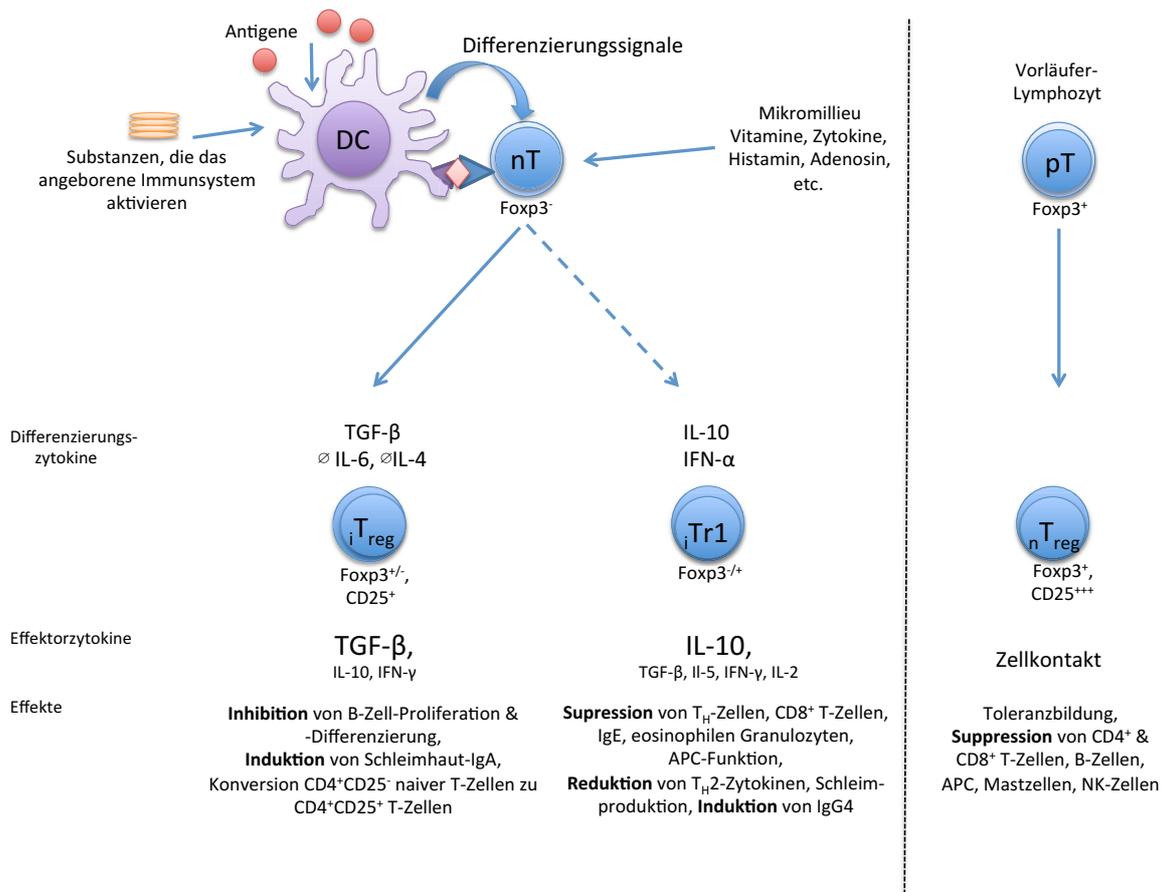
### **1.2.11.1 IL-10**

Nachdem man lange davon ausging, dass IL-10 hauptsächlich zu den Th2-assoziierten Zytokinen gehöre [165], hat man im Laufe der Jahre immer mehr IL-10-Quellen gefunden. Dazu gehören neben Th1-Zellen und regulatorischen T-Zellen auch Makrophagen und dendritische Zellen. Es wurde festgestellt, dass IL-10 nicht nur die Th1- sondern auch die Th2-Antworten dämpfte [166-171]. IL-10 ist sogar notwendig, um die allergische Hyperreaktivität der Atemwege zu mindern, da die Stärkung der Th1-Immunantwort allein dazu nicht in der Lage scheint [172,173]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und IL-10 produzierende Tr1-Zellen sind im Blut von gesunden Probanden in höheren Anteilen vorhanden als im Blut atopischer Patienten [89,90,174]. Darüber, ob die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen systemisch bei allergischen Erkrankungen herab- oder heraufgesetzt ist, existiert keine eindeutige Datenlage. Bezüglich Tr1-Zellen haben Han et al. noch vor wenigen Jahren gezeigt, dass die Anzahl dieser Zellen im Blut von Patienten mit allergischer Rhinitis herabgesetzt war [73].

Es folgten Untersuchungen über das Verhalten regulatorischer T-Zellen und IL-10 während spezifischer Immuntherapien. Bonvalet et al. zeigten eine Herunterregulierung der IL-10 mRNA sowohl in PBMCs einer SLIT- als auch einer Placebogruppe zwei und vier Monate nach Beginn der Therapie. Die IL-10-Zytokinproduktion nahm jedoch nur in der SLIT-Gruppe signifikant ab [175]. Im Gegensatz dazu veröffentlichten Lou et al. gleichzeitig ihre Untersuchungen, nach welchen ein Jahr nach Beginn der spezifischen Immuntherapie die IL-10-Produktion der PBMCs signifikant gesteigert war. Des Weiteren

fanden sich signifikant mehr Tr1-Zellen unter ihnen [176]. Jutel et al. fanden heraus, dass innerhalb der ersten 70 Tage nach Beginn einer spezifischen Immuntherapie sowohl IL-5 und IL-13 als auch IFN- $\gamma$  von allergenstimulierten PBMCs in immer geringeren Mengen produziert wurden. Gleichzeitig stieg jedoch die IL-10- und TGF- $\beta$ -Produktion [177]. Francis et al. fanden in einer ähnlichen Untersuchung nach länger durchgeführter spezifischer Immuntherapie keine signifikanten Veränderungen der Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen oder TGF- $\beta$ . Es kam allerdings ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL-10 [95]. Die nasale Immuntherapie war sogar in der Lage die nasalen IL-10-Konzentrationen anzuheben verglichen mit einer Placebothherapie [178].

Alles in Allem scheinen IL-10 produzierende Tr1-Zellen eine wichtige Rolle für die Toleranzentwicklung während der spezifischen Immuntherapie zu spielen. Regulatorische T-Zellen produzieren hauptsächlich IL-10 und TGF- $\beta$ . CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg- Zellen produzieren hauptsächlich TGF- $\beta$ . Tr1-Zellen produzieren vorwiegend IL-10 (Abb. 3) [179,180].



**Abb. 3: Regulatorische T-Lymphozyten links:** Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (DC) im Zusammenspiel mit weiteren umgebenden Faktoren induziert in nativen T-Zellen (nT) die Differenzierung zu entweder induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iT<sub>reg</sub>) oder induzierbaren regulatorischen T-Zellen vom Typ 1 (Tr1). Diese T-Zellen können Entzündungsreaktionen dämpfen. Die Effekte werden durch ihre jeweiligen Zytokinprofile, umgebende Chemokine und Interaktionen mit anderen Zellen vermittelt. **rechts:** Natürliche regulatorische T-Zellen reifen im Thymus heran. (pT: Präkursor- T-Lymphozyt; nT<sub>reg</sub>: natürlicher regulatorischer T-Lymphozyt)

Modifiziert nach:

1. Akdis M, BLASER K, Akdis C. T Regulatory Cells in Allergy. Karger Publishers; 2006. p. 159–173.
2. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. Immunol. Rev. 2001 Aug;182(1):68–79.
3. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact- dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med. 2001;194:629–644.
4. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, et al. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T suppressor cell clones produce TGF-β, but not IL-10 and are distinct from type 1 T regulatory cells. J Exp Med. 2002; 196:1335–1346.
5. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Clin Transl Allergy. 2012;2(1):2.
6. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S. ScienceDirect - Cytokine & Growth Factor Reviews : Biology of interleukin-10. Cytokine & growth factor Reviews. 2010.

### 1.2.11.2 IL-16

Sowohl Gewebs- und Epithel- als auch Immunzellen sind in der Lage IL-16 zu bilden [181,182]. Unter den Immunzellen kann IL-16 von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, dendritischen Zellen, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und B-Zellen produziert werden [183-187]. Ursprünglich war IL-16 unter der Bezeichnung LCF (für *leukocyte chemoattractant factor*) bekannt, da es chemotaktisch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Monozyten und eosinophile Granulozyten wirkt [188-190]. Aufgrund dieser Eigenschaften kam man schon

bald nach der Entdeckung dieses Interleukins dazu, seinen Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen zu untersuchen [181,191,192].

Sowohl in Histamin-stimulierten Zellkulturüberständen der Atemwegszellen von Asthmapatienten als auch in BAL und Bronchialbiopsien allergenstimulierter Lungen von Asthmapatienten ließ sich eine erhöhte IL-16 Expression nachweisen [193-195]. Außerdem wurden auch in Untersuchungen atopischer Dermatitis [192] sowie allergischer Rhinitis [196-198] signifikant erhöhte IL-16 Expressionen in Proben erkrankter Probanden im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden.

### **1.3 Fragestellung**

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob IL-33 und sST2 bei Patienten mit symptomatischer allergischer Rhinitis freigesetzt wird und in welcher Relation es zu weiteren Zytokinen und den Symptomen der Patienten steht.

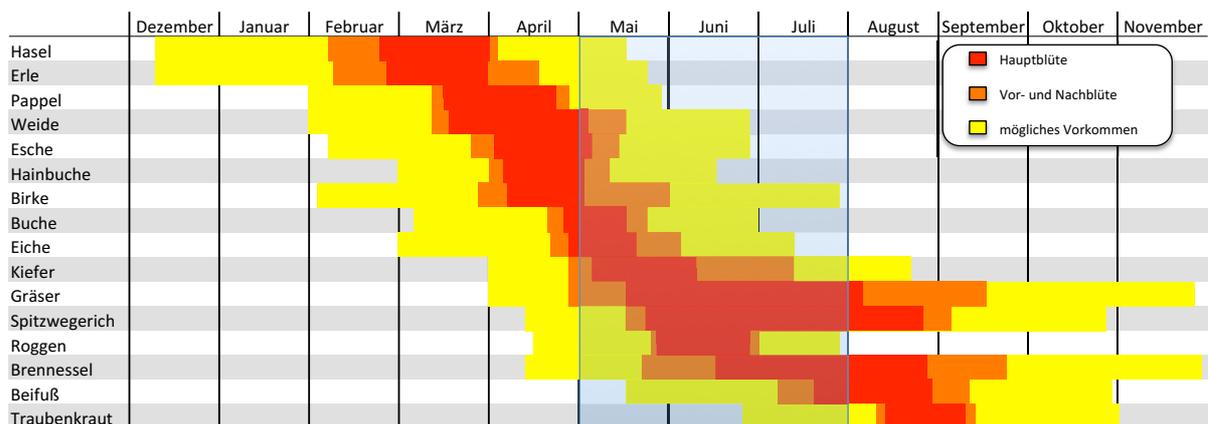
Bis heute fehlt es an einem vollständigen Verständnis der komplexen Mechanismen, die zur Ausbildung der Symptome einer allergischen Rhinitis führen. Gegenwärtig ergeben sich aus der Vielzahl an Zyto- und Chemokinen, die dabei eine Rolle zu spielen scheinen bereits erste therapeutische Ansätze, die in Zukunft die aktuellen, symptomatischen Therapiemöglichkeiten der allergischen Rhinitis ergänzen könnten [199]. Dennoch ist weitere Forschung auf diesem Gebiet unverzichtbar. Zur Identifizierung solch potentieller therapeutischer Ziele mangelt es nicht an Provokationsstudien und Untersuchungen systemischer Zyto- und Chemokinkonzentrationen. Jedoch finden sich nur spärlich Studien über die lokale Expression von Zytokinen und Chemokinen, besonders nicht von IL-33 und sST2, während saisonaler allergischer Rhinitis durch Zellen der Nasenschleimhaut nach natürlicher Allergenexposition. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, neben IL-33 und sST2 auch die Konzentrationen von Th1-, Th2-, Th17- und regulatorischen T-Zellzytokinen sowie Chemokinen in Nasenlavagen von Probanden mit allergischer Rhinitis während der Allergiesaison mit denen von gesunden Kontrollen zu vergleichen. Die Auswahl der Zyto- und Chemokine erfolgte dabei ganz bewusst, aufgrund ihrer bisher bekannten Rollen in der allergischen Entzündungsreaktion. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob sich Korrelationen zwischen den Messergebnissen und den klinischen Symptomen finden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign:

Um die Frage nach der lokalen Freisetzung von IL-33 und sST2 aus Zellen der Nasenschleimhaut zu beantworten, wurden in einer Querschnittstudie die IL-33- und sST2-Konzentrationen aus Nasenlavagen von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis und gesunden Kontrollprobanden miteinander verglichen.

Die Studie wurde am 06.05.2010 begonnen. Vom 06.05. bis zum 04.08.2010 wurden aufgrund der Pollenflugsaison die Probanden mit allergischer Rhinitis untersucht. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da es sich um die Hauptflugsaison der Gräserpollen handelt (Abb. 4). Alle Probanden mit allergischer Rhinitis reagierten im Skin-Prick-Test allergisch auf Gräserpollen. Daraufhin erfolgte vom 05.08. bis zum 12.11.2010 die Aufnahme der Kontrollprobanden in die Studie.



**Abb.4: Pollenflugkalender** mit Markierung des Studienzeitraums für die Untersuchung der Probanden mit allergischer Rhinitis (blau, nach Pollendaten der Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst von 2000-2007).

Die Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität bewilligt (Studiennummer 3530).

## 2.2 Probanden und Proben

### 2.2.1 Probanden

Für alle Probanden wurden folgende Ausschlusskriterien aufgestellt:

- Kinder & Jugendliche (<18. Lebensjahr)
- Schwangerschaft und Stillzeit
- chronische Rhinosinusitis (CRS Diagnose oder Verdacht)
- Nasenoperation in den vorausgegangenen drei Monaten
- antiallergische Medikation in den vorausgegangenen zehn Tagen (z.B. topische Steroide)
- Hyposensibilisierung gegen Pollenantigene in den vorausgegangenen drei Jahren
- klinische Milbenallergie im Sinne ganzjähriger allergischer Beschwerden
- Medikamente gegen HIV und Depressionen, Immunsuppression
- akute Erkältung, Infekt in den vorausgegangenen zwei Wochen
- unkontrolliertes Asthma bronchiale

Einschlusskriterien waren:

- Allergische Rhinitis mit nachgewiesener allergischer Sensibilisierung gegen Gräser
- Einwilligung in die Studie
- mindestens drei Punkte im Summenscore der nasalen Beschwerden (siehe Text)

Die Einstufung der Probanden erfolgte mit Hilfe zweier Fragebögen. Ein Fragebogen wurde speziell für die Studie erstellt. Der andere Fragebogen wird im Rahmen der Anamneseerhebung in der Allergiesprechstunde der HNO-Klinik (Uniklinik Düsseldorf) routinemäßig verwendet. Des Weiteren wurde bei den Probanden ein Skin-Prick-Test durchgeführt, der ebenfalls dem Standard der Allergiesprechstunde entsprach.

Die Erfassung der einzelnen klinischen Beschwerden erfolgte mittels eines vierstufigen-Punktescores. Die Probanden stufen ihre Symptome in einer steigenden Wertung von „keine“ über „gering“, „mäßig“ bis „stark“ ein. Dabei entsprachen null Punkte der Einstufung „keine“ und drei Punkte „stark“ (Muster im Anhang: Probandenfragebogen, Fragebogen Allergiesprechstunde, Skin-Prick-Test Bogen). Die Punkte der vier nasalen Beschwerden: behinderte Nasenatmung, Nasenlaufen, Niesreiz und Juckreiz in der Nase wurden zu einem Summenscore addiert. Der Score der Gesamtstärke der allergischen Beschwerden blieb unverändert mit einer möglichen Punktzahl von null bis drei.

Schließlich erfolgte bei jedem Probanden eine Blutentnahme. Die daraus angefertigten Differentialblutbilder der Probanden wurden für die Einstufung berücksichtigt. Alle Probanden wurden vor der Teilnahme über den Inhalt und den Ablauf der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis (Muster im Anhang: Einverständniserklärung, Patienteninformation).

### Probanden mit allergischer Rhinitis

Insgesamt wurden 19 potentielle Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis gescreent. Für die Studie wurden davon 15 Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis entsprechend der Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt. Diese wiesen anamnestisch alle eine saisonabhängige Rhinitissymptomatik auf und waren im Skin-Prick-Test gegen das Gräserpollenallergen sensibilisiert. Die acht Frauen und sieben Männer waren im Durchschnitt 28,4 Jahre alt (22-52 Jahre). Alle Probanden hatten zum Zeitpunkt der Probengewinnung gering bis mäßig ausgeprägte allergische Beschwerden, da die Probengewinnung in der Allergiesaison im Zeitraum Mai bis Juli 2010 stattfand.

### Kontrollprobanden

Insgesamt wurden 34 Probanden als mögliche Kontrollprobanden gescreent. Unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien wurden für die Studie 14 gesunde Probanden als Kontrollen ausgewählt.

Sie wiesen keine allergischen Beschwerden auf und waren im Skin-Prick-Test weder gegen saisonabhängige Allergene, noch gegen perenniale oder Tierhaar-Allergene sensibilisiert. Außerdem lag bei keinem der Kontrollprobanden eine Eosinophilie vor. Die neun Frauen und fünf Männer waren im Durchschnitt 29 Jahre alt (23-50 Jahre). Die Probengewinnung fand im Zeitraum August bis November 2010 statt.

## **2.2.2 Proben**

### Nasenlavage

Bei der Nasenlavage wird die Nase des Probanden mit einer 0,9% Natriumchloridlösung durchspült. Die Lösung wird für zehn Sekunden in der Nase gehalten und danach in einem sterilen Becher gesammelt. Sich auf der Nasenschleimhaut befindliche Partikel, Zellen und Mediatoren werden so ausgespült. Der Ablauf wurde jedem Probanden zuvor genau erklärt. Zur Durchführung wurde eine Spritze mit 10ml 0,9% Natriumchloridlösung

aufgezogen. Zunächst legte der Proband den Kopf in den Nacken ( $>30^\circ$ ) und schloss den weichen Gaumen dicht gegen den Rachen (Hilfestellung für den Probanden: „Kuckuck“ sagen). Da der Proband ab diesem Zeitpunkt keine Luft mehr bekam, wurden mit der Spritze zügig erst in das linke, dann in das rechte Nasenloch je 5ml Natriumchloridlösung (NaCl) appliziert. Dabei wurde darauf geachtet, die Spritze nicht in Richtung des Septums sondern in Richtung der Nasenmuscheln auszurichten. Sobald die NaCl-Lösung in das erste Nasenloch gegeben worden war, wurde die Stoppuhr gestartet. Im Verlauf der folgenden zehn Sekunden, in denen der Proband die Lösung in der Nase behielt, wurde ihm ein Becher in die eine Hand und ein Kosmetik-Tuch in die andere Hand gereicht. Nach den 10 Sekunden, beugte der Proband sich weit vor und hielt den Becher unter seine Nase. Sobald keine Lösung mehr in den Becher tropfte, gab der Proband den Becher ab. Die Nasenlavage wurde in ein mit dem Probandennamen beschrifteten 10ml Falcon Tube umgefüllt und daraufhin für ca. fünf Sekunden kräftig geschüttelt, um Sekretfäden oder andere feste Bestandteile zu lösen. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Röhrchen in einem  $4^\circ\text{C}$  Kühlschrank gekühlt. Falls der Proband nicht verhindern konnte, zu schlucken, wurde trotzdem versucht nach zehn Sekunden noch die restliche Flüssigkeit aufzufangen oder ein weiterer Versuch nach einer Stunde begonnen. Zwischen 5 und 8ml Nasenlavage wurden pro Durchgang zurückgewonnen. Innerhalb von zwei Stunden wurden im Labor mit der Weiterverarbeitung und Aliquotierung begonnen.

#### Aliquotierung der Nasenlavage

Die Nasenlavagen wurden in einer Styroporbox mit Kühlelementen in das Labor transportiert. Dort wurden sie über fünf Minuten mit  $500\times g$  (Beschleunigung und Abbremsung Stufe 3 entsprachen zusätzlichen zwei Minuten) in einer auf  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Danach wurden die Nasenlavagen vorsichtig auf den Arbeitsbereich der Bühne gestellt und aufgeschraubt. Mit einer 10ml Glaspipette wurde der Überstand bis auf durchschnittlich  $500\mu\text{l}$  abpipettiert. Der Überstand wurde in ein neues 10ml Falcon Tube gegeben und für fünf Minuten in einem Ultraschallbecken homogenisiert. Vor dem Aliquotieren wurde die Lavageflüssigkeit mehrmals geschwenkt und dann mit  $1000\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipetten in  $450\mu\text{l}$  Portionen in die dafür vorgeschriebenen  $1,5\text{ml}$  low-bind-Tubes pipettiert. Alle Tubes waren mit der Probandennummer, aber nicht mehr mit dem Namen des Probanden, beschriftet. Die Nasenlavage-Tubes wurden in einer Kryobox im  $-20^\circ\text{C}$  Gefrierschrank für maximal zwei Wochen gesammelt. Danach wurden die Kryoboxen dann in  $-80^\circ\text{C}$  Gefrierschränken gelagert.

## Blutentnahme und Differentialblutbild

Jedem Probanden wurden 3ml EDTA-Blut entnommen. Zur Blutentnahme wurde der Arm des Probanden gestaut und eine oberflächliche Vene der Ellenbeuge mit dem Butterfly-Vacutainer-Blutentnahmesystem (BD, UK) punktiert. Die verwendeten Blutentnahmeröhrchen waren mit einem Unterdruck versehen. Nach Einstechen der mit der Kanüle über einen Schlauch verbundenen Adapternadel in das Röhrchen, saugte sich das vom Hersteller angegebene Blutvolumen in das 3ml EDTA-Plasmaröhrchen. Alle Blutröhrchen wurden nach der Entnahme acht bis zehn Mal gewendet. Aus dem Blut wurden im Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf Differentialblutbilder angefertigt.

## 2.3 Material

### 2.3.1 Technische Geräte

Die in Tabelle 1 aufgeführten technischen Geräte wurden im Rahmen der Studie verwendet (Tabelle 1).

Stoppuhr TR118	Oregon Scientific, Deutschland
Kühlschrank	Phillip Kirsch GmbH, Deutschland
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, USA
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Ultraschallbad Transsonic T310	Elma, Deutschland
Bühne BS 5726 NSF 49	Clean Air, Deutschland
-20er Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr, Deutschland
-80er Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, USA
Schüttler	Eppendorf A.G., Deutschland
Sector® Imager 6000	Meso Scale Discovery, USA
ELISA Reader DTX 880 Multimode Detector	Beckmann Coulter GmbH, Deutschland

**Tabelle 1: Technische Geräte**

### 2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Die in Tabelle 2 aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden im Rahmen der Studie verwendet (Tabelle 2).

Natriumchloridlösung 0,9%	B.Braun Melsungen A.G., Deutschland
Aqua dest.	B.Braun Melsungen A.G., Deutschland
PBS	Gibco by Life Technologies Corporation USA, UK, NZ
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Spritzen (10ml, Injekt)	B.Braun Melsungen A.G., Deutschland
Urinbecher	Sarstedt A.G. und Co., Deutschland
Kosmetiktücher (Cluo-Prestige)	Wepa Professional, Deutschland
Cellstar® Tubes (10ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
LowBind Tubes (0,5ml, 1,5ml)	Eppendorf A.G., Deutschland
Eppendorf Research Pipetten (200 µl, 500µl, 1000µl)	Eppendorf A.G., Deutschland
Tip One Pipettenspitzen (100µl, 300µl, 500 µl, 1000µl)	Star Lab, Deutschland

Eppendorf Research Pro 8-Kanal Pipette	Eppendorf A.G., Deutschland
Avery Vielzwecketiketten	Avery Dennison Corporation, Deutschland
Sharpie Extra Fine Tip Labmarker	Sigma Aldrich, Deutschland
Stripette Stabpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning Incorporated, USA
BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set und One Use Holder	BD Vacutainer®, United Kingdom
EDTA Röhrchen (3ml)	BD Vacutainer®, United Kingdom
PCR Adhesive Sheets	Eppendorf A.G., Deutschland
MiniSart Filter (0,2µm, 0,4µm)	Sartorius A.G., Deutschland
FFP2 Mundschutz	3M Healthcare, Deutschland

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

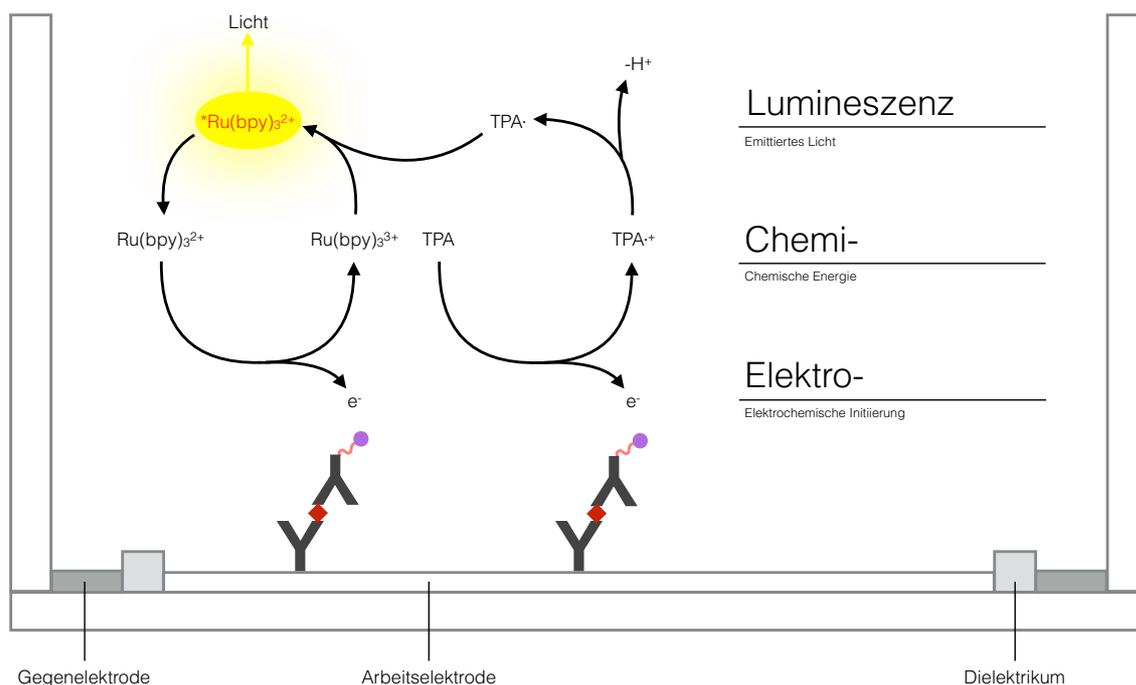
## 2.4 Methoden

### 2.4.1 MSD Multispot-Assay Systeme

Um umfangreiche Konzentrationsmessungen für Zytokine in Nasenlavagen durchzuführen, sind hochempfindliche Methoden notwendig, da aufgrund des Verdünnungseffektes in der Lavage-Flüssigkeit mit sehr niedrigen Konzentrationen gerechnet werden muss.

Das MSD *Multispot-Assay* System eignet sich durch seine hohen Sensitivitäten, um die extrem geringen Zytokinkonzentrationen in Nasenlavagen im Pikogrammbereich zu erfassen.

Es basiert auf dem Prinzip der Elektrochemilumineszenz. In jedem Well der 96-Well Platten befinden sich verschiedene Elektroden-Spots, die mit den *capture antibodies* der Zytokine bzw. Chemokine überzogen sind, die gemessen werden sollen. Eine Besonderheit der Platten ist die Karbonoberfläche. Diese weist deutlich bessere Bindungseigenschaften für biologische Materialien, wie zum Beispiel Proteine, Nukleinsäuren und Zellmembranen, auf als Plastik. So kann es auf Plastik je nach Analyt zu einer 10- bis 50-fach erhöhten Bindung kommen. Schrittweise werden die Probe, die *detection antibodies* und *Read Buffer T* hinzugegeben.



**Abb. 5: Elektrochemilumineszenzprinzip von Meso Scale Discovery**

Die *detection antibodies* sind mit elektrochemilumineszenzfähigen Bestandteilen markiert. Es handelt sich um einen Ruthenium-basierten so genannten *Sulfo-Tag*. Dieser *Tag* emittiert Licht einer Wellenlänge von 620nm. Die Emission wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes induziert, bei dem das TPA (Tripropylamine) im *Read Buffer T* als Elektronendonator auf das *Sulfo-Tag* fungiert. Der *Read Buffer T* schafft also die nötige chemische Umgebung, um die Elektrochemilumineszenz hervorzurufen.

Die Platte wird zur Analyse in das *Sector Instrument* gestellt, wo eine Spannung an die Plattenelektroden angelegt wird. Dieser elektrische Stimulus findet nur innerhalb eines bestimmten Abstandes zum Boden statt ( $\sim 10\mu\text{m}$ ), so dass auch nur *Sulfo-Tag* markierte Antikörper, die gebunden sind, angeregt werden und somit Licht emittieren (Abb. 5). Dieser so genannte Proximitätseffekt reduziert den Hintergrund und ist ein Grund für die erhöhte Sensitivität dieser Assays. Die Intensität des emittierten Lichts wird über eine hochauflösende CCD Kamera im *Sector Instrument* erfasst.

Mit Hilfe der Standardkurve können dann die einzelnen Zytokinkonzentrationen, sofern sie sich im linearen Bereich der Standardkurve befinden, berechnet werden. Dieser lineare Bereich kann sich über bis zu 5 log-Stufen darstellen.

Verglichen mit ELISA bietet das *Multi-Spot Assay* System Vorteile. Der große dynamische Messbereich über vier bis fünf logs ermöglicht eine genaue Quantifizierung unverdünnter Proben. Entscheidend für den dynamischen Messbereich sind die Qualität der Antikörper und der lineare Detektionsbereich der CCD Kamera über 6 log-Stufen. Die Messbereiche des ELISA sind im Allgemeinen enger, weshalb der zuvor unbekannt Konzentrationbereich der Proben durch Austesten erst ermittelt werden muss. Dies erfordert einen höheren Probenverbrauch, wobei pro Well nur eine Messung erfolgen kann. Das Multiplexen in einem Well basiert auf einer rein räumlichen Trennung, da das emittierte Licht von jedem Spot eine Wellenlänge von 620nm hat. Aufgrund der hohen Auflösung der CCD Kamera, kann jedoch das emittierte Licht jedem einzelnen Spot zugeordnet werden. So erfolgen bis zu 10 Messungen in einem Well gleichzeitig.

Der Vorteil des *Multi-Spot Assay* Systems liegt also in der Ersparnis an Probenmaterial, da es unverdünnt angewendet werden kann und Mengen von 25µl ausreichen, um mehrere Zytokine gleichzeitig zu quantifizieren.

Die hohen Sensitivitäten des MSD *Multi-Spot Assay* Systems lassen sich anhand der *lower limits of detection (LLOD)* erkennen. Diese sind für jedes Zytokin (oder Chemokin) niedrig gehalten, sodass das Assay System mit ELISA Einzelmessungen vergleichbar ist. Die Kreuzreaktivität liegt bei allen MSD Multiplex Assay Kits in der Regel <0,1%. Sie wurde mit Calibratoren gemessen, in denen einzelne Zytokine zwischen 2500 und 10000pg/ml konzentriert waren. Diese hohen Konzentrationen wurden gewählt, um hochspezifische Signale zu erhalten, sodass der Test auch bei mäßigen Kreuzreaktivitätsniveaus sensitiv ist. Die Kreuzreaktivität wurde dann ermittelt, indem die Signalstärken auf den nicht-spezifischen Punkten mit der auf dem spezifischen Punkt verglichen wurden. Der vom Hersteller angegebene LLOD eines Zytokins (Tabellen 3 und 4) ist die durchschnittliche Konzentration des Signals, das 2,5 Standardabweichungen über der des Null-Calibrators liegt.

	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12p70	IL-13
LLOD (pg/ml)	0,55	0,43	0,16	0,07	0,51	2	1,3

**Tabelle 3:** Vom Hersteller angegebene LLOD der Zytokine

	Eotaxin	MIP-1 $\beta$	Eotaxin-3	TARC	IP-10	IL-8	MCP-1	MDC	MCP-4
LLOD (pg/ml)	23	7,5	6,1	15	12	0,6	8	334	8,4

**Tabelle 4:** Vom Hersteller angegebene LLOD der Chemokine

### Ultra sensitive Kit (MSD) für Th1- und Th2-Zytokine

Mithilfe des MSD Multispot-Assay Systems können die Th1 Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und IL-12p70 und die von Th2-Zellen gebildeten Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 gemessen werden. Auf einer 96-Well Platte befinden sich in jedem Well bis zu zehn Elektroden-Spots, die mit den *capture antibodies* der genannten Zytokine überzogen sind.

Der Assay wurde der Anleitung des Herstellers entsprechend durchgeführt. Das im Kit enthaltene Diluent 2 wurde invers in die Wells pipettiert und die ganze Platte wurde fünf Sekunden *highspeed* geschüttelt. Es erfolgte eine 30 minütige Blockierung mit dem Diluent 2 auf dem Schüttler (700rpm) bei Raumtemperatur. Die Nasenlavage-Aliquots wurden unmittelbar vor dem Auftragen auf die Platte für zwei Sekunden gevortext, um eine ausgeglichene Verteilung aller enthaltenen Partikel zu bewirken und mögliche Wandadhärenzen zu lösen, und bei Raumtemperatur für zwei Minuten bei 3000rpm zentrifugiert, um alle festen Bestandteile zu entfernen.

Für die Herstellung der Standardlösung wurde die im Kit enthaltene Calibratorlösung mit 0,9% Natriumchloridlösung, die zu einem Prozent BSA enthielt, zu einer Standardreihe verdünnt. Proben, *Blanks* und Standard wurden im Duplikat gemessen und bei Zimmertemperatur für zwei Stunden auf dem Schüttler mit 700rpm inkubiert. Der *detection antibody* wurde ebenfalls für zwei Stunden mit 700rpm auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Sowohl Diluent 2 und *detection antibodies* als auch der Read Buffer T wurden invers pipettiert. Die Messung fand auf dem *Sector Imager 6000* der Firma Meso Scale Discovery (MSD) statt.

Das *lower limit of detection* (LLOD) wurde auf das zweifache der Standardabweichung oberhalb des *Mean* des *Blanks* festgelegt (Tabelle 5).

	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12p70	IL-13
LLOD (pg/ml)	0,2688	0,1632	0,0912	0,0624	0,132	0,7504	0,4144

**Tabelle 5:** LLOD der mit dem MSD Multispot-Assay System durchgeführten Messungen

Proben, deren IL-5-Messungen einen Variationskoeffizienten (CCV entspricht *calculated concentration coefficient of variation*) über 20 hatten, wurden nachgemessen.

#### Ultra sensitive Kit (MSD) für Chemokine

Sowohl die  $\alpha$ -Chemokine (CXC) IL-8 und IP-10 als auch die  $\beta$ -Chemokine (C-C) MCP-1 und -4, Eotaxin -1 und -3, MIP-1 $\beta$ , MDC und TARC können detektiert werden. Der Assay wurde ebenfalls den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt (Tabelle 6).

	Eotaxin	MIP-1 $\beta$	Eotaxin-3	TARC	IP-10	IL-8	MCP-1	MDC	MCP-4
LLOD (pg/ml)	22	6,008	65,2	6,632	74	8,32	19,68	11,4	15,28

**Tabelle 6:** LLOD der mit dem MSD Multispot-Assay System durchgeführten Messungen

Proben, deren MCP-4- oder Eotaxin-3-Messungen einen Variationskoeffizienten (CCV entspricht *calculated concentration coefficient of variation*) über 20 hatten, wurden nachgemessen.

#### Ultra sensitive Kit (MSD) für IL-16 und IL-17

Dieses Kit ist mit *capture* und *detection antibodies* für die Zytokine IL-16 und IL-17 ausgestattet. Auch dieser Assay wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt (Tabelle 7). Die Anzahl der gemessenen Proben wich in diesen Fällen ab. Es wurden alle 15 Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis und 11 Proben von Kontrollprobanden gemessen.

	IL-16	IL-17
LLOD (pg/ml)	0,888	0,2552

**Tabelle 7:** LLOD der mit dem IL-16 und IL-17 Assay durchgeführten Messungen

### 2.4.2 ELISA

Zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung von IL-33 und sST2 wurden ELISA-Kits der Firmen Biologend und R&D Systems verwendet.

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) basiert auf dem Sandwich- Prinzip. Der Boden der Wells einer Platte mit maximal 96 Wells (entsprechend zwölf 8-Well Stripes) ist gleichmäßig mit antigenspezifischen Primärantikörpern, so genannten *capture antibodies*, beschichtet. Diese können das gesuchte Protein im Sinne einer Antigen-

Antikörperreaktion spezifisch binden. Nach Zugabe des zu testenden Probenmaterials, kann der Primärantikörper sein Epitop erkennen und das Protein binden, sofern es in der Probe enthalten ist. Im nächsten Schritt werden Sekundärantikörper, so genannte *detection antibodies*, hinzugegeben. Diese erkennen ein anderes Epitop des gesuchten Proteins und können an diesem mit hoher Affinität binden. Der Begriff des Sandwiches erklärt sich hier dadurch, dass das gesuchte Protein nun zwischen zwei Antikörpern (Primär- und Sekundärantikörper) gebunden ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym (Avidin-Horseradish-Peroxidase) gekoppelt, welches im letzten Schritt das zuzugebende Substrat spaltet und dadurch einen Farbumschlag ins Blaue hervorruft. Die Reaktion wird nach einer festzulegenden Zeit mittels einer Stopper-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag ins Gelbe stattfindet. Da die Platte zwischen den einzelnen Schritten gründlich gewaschen wird, kann der Farbumschlag nur von gebundenen Antikörpern bewirkt werden. Die Farbbintensität ist proportional zur Protein- bzw. in diesem Fall Zytokin-Konzentration und kann photometrisch in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 562nm bestimmt werden. Auf die Konzentration im Probenmaterial kann dann mit Hilfe einer gleichzeitig angelegten Standardkurve geschlossen werden. Diese Kurve ergibt sich aus einer Reihe Standardlösungen mit bekannten, aufsteigenden Konzentrationen des Proteins, die gleichzeitig zu den Proben mit dem Versuch mitlaufen. Proben, deren sST2-Messungen einen Variationskoeffizienten (CV entspricht *coefficient of variation*) über 20 ergaben, wurden nachgemessen.

### **2.4.3 Kits/gebrauchsfertige Systeme**

Ultra sensitive Kit von Meso Scale Discovery (MSD) für die folgenden Zyto- und Chemokine: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-16, IL-17, Eotaxin, Eotaxin-3, MIP-1 $\beta$ , TARC, IP-10, IL-8, MCP-1, MCP-4, MDC

Quantikine® ELISA Human ST2/IL-1 R4 Immunoassay

(R&D Systems Europe, Abingdon, UK)

LEGEND MAX™ ELISA Kit with Pre-coated Plates - Human IL-33

(BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA)

#### 2.4.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programmes GraphPad Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA) für die beiden Gruppen: allergische Rhinitis und Kontrollen. Zunächst wurden in jeder Gruppe jeweils die Konzentrationen für jedes Zytokin mit Hilfe des d'Agostino Pearson Tests auf Normalverteilung untersucht. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte ein erneuter Test auf Normalverteilung nach logarithmischer Transformation der Werte.

Ließ sich auch nach log-Transformation keine Normalverteilung feststellen (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17), so wurde der P-Wert mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney Tests (ungepaart) errechnet. Lag von Anfang an oder nach log- Transformation eine Normalverteilung vor (IL-2, IL-8, IL-12, IL-13, IP-10, MDC, sST2, TARC), so wurde ein t-Test (ungepaart, *two-tailed*) durchgeführt. Lag dann der P-Wert der Varianz  $<0,05$ , so wurde eine Welch's- Korrektur ergänzt (Eotaxin, IL-5, IL-16, MCP-1, MCP-4, MIP-1 $\beta$ ). Ein P-Wert von  $<0,05$  (beidseitig) wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman-Tests berechnet.

### **3. Ergebnisse**

Für die Untersuchung der Nasenlavagen von 15 Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis und 14 gesunden Kontrollprobanden wurden IL-33 und sST2 ELISA sowie auf dem Prinzip der Elektrochemilumineszenz basierende Multispot-Assays durchgeführt.

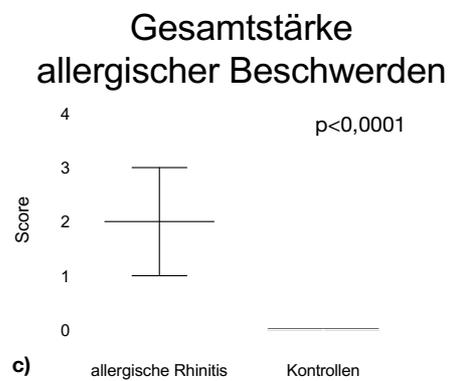
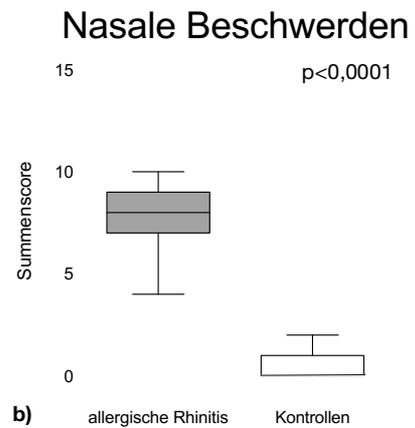
Alle 15 Probanden mit allergischer Rhinitis zeigten zum Zeitpunkt der Nasenlavage klinische Symptome der allergischen Rhinitis. Alle 14 Kontrollprobanden waren zum Zeitpunkt der Nasenlavage gesund und beschwerdefrei. Mit allen Probanden wurden die Nasenlavagen erfolgreich durchgeführt. Bei einer Person aus der Gruppe der Kontrollprobanden war ein zweiter Anlauf zur Nasenlavage eine Stunde später erforderlich. Bei dem ersten Versuch gelang es der Person nicht, die Natriumchloridlösung in der Nase zu halten. Die Blutentnahme war bei allen Probanden komplikationslos möglich.

#### **3.1 Nasale Beschwerden und Gesamtstärke allergischer Beschwerden**

Es wurden mit Hilfe der Fragebögen vier nasale Beschwerden erfasst: behinderte Nasenatmung, Nasenlaufen, Niesreiz und Juckreiz in der Nase. Die Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis hatten signifikant stärkere nasale Beschwerden als die Kontrollprobanden ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 6a und 6b).

Die Gesamtstärke der allergischen Beschwerden wurde ebenfalls erfragt. Alle Kontrollprobanden gaben hier an, keine Beschwerden zu haben. Alle Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis gaben geringe bis starke Gesamtbeschwerden an ( $p < 0,0001$  nach Chi-Quadrat) (Abb. 6a und 6c).

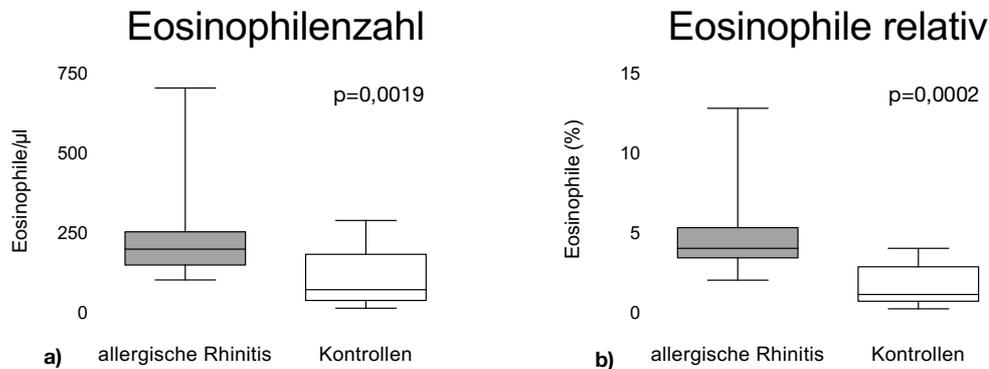
	allergische Rhinitis	Kontrollen
<u>Anzahl (n)</u>	15	14
<u>nasale Beschwerden</u>		
Minimum	4	0
25% Perzentile	7	0
Median	8	0
75% Perzentile	9	1
Maximum	10	2
<u>Gesamtbeschwerden</u>		
Minimum	1	0
25% Perzentile	2	0
Median	2	0
75% Perzentile	2	0
Maximum	3	0



**Abb. 6: Allergische Beschwerden** a) tabellarische Darstellung der nasalen Beschwerden (oben) und der Gesamtbeschwerden (unten); b) graphische Darstellung des Summenscores der nasalen Beschwerden in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum); c) graphische Darstellung der Gesamtbeschwerden in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum).

### 3.2 Eosinophile Granulozyten im Differentialblutbild

Sowohl die absoluten ( $p=0,0019$ ) als auch die relativen Eosinophilenzahlen ( $p=0,0002$ ) zeigten eine signifikante Erhöhung auf Seiten der Probanden mit allergischer Rhinitis (Abb. 7).

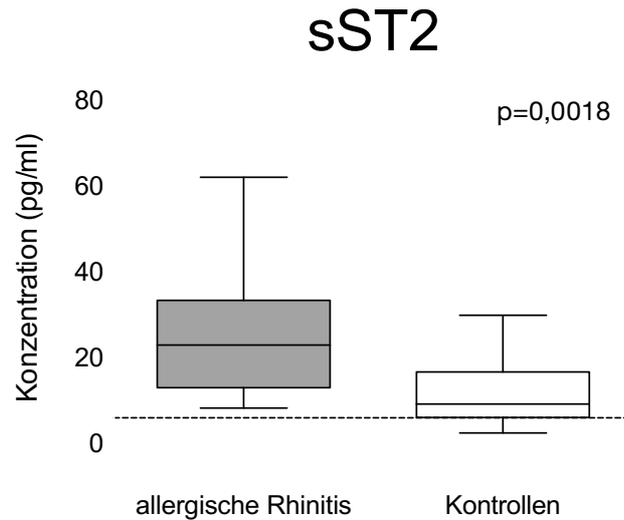


**Abb. 7:** a) absolute und b) relative Eosinophilenzahl im Blut in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum).

### 3.3 IL-33 und sST2

IL-33 konnte weder in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis, noch in denen der gesunden Kontrollprobanden nachgewiesen werden. Die Konzentrationen aller Proben befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze des IL-33 ELISA (5,69 pg/ml).

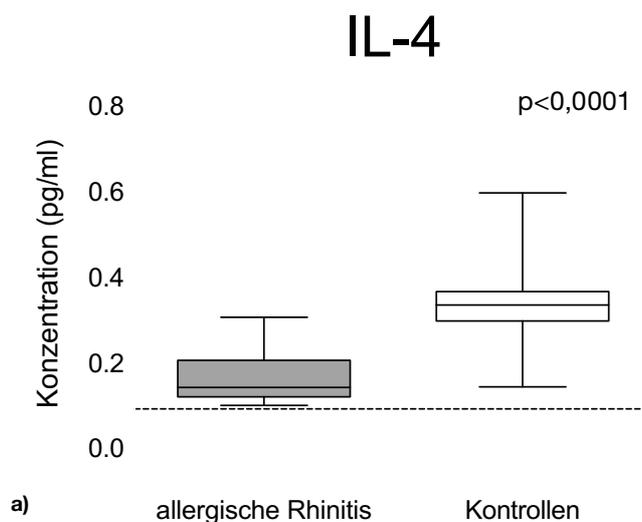
Es fand sich eine signifikante Erhöhung des sST2 in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis verglichen mit den Nasenlavagen der Kontrollprobanden ( $p=0,0018$ ; Abb. 8; Tabelle 8).

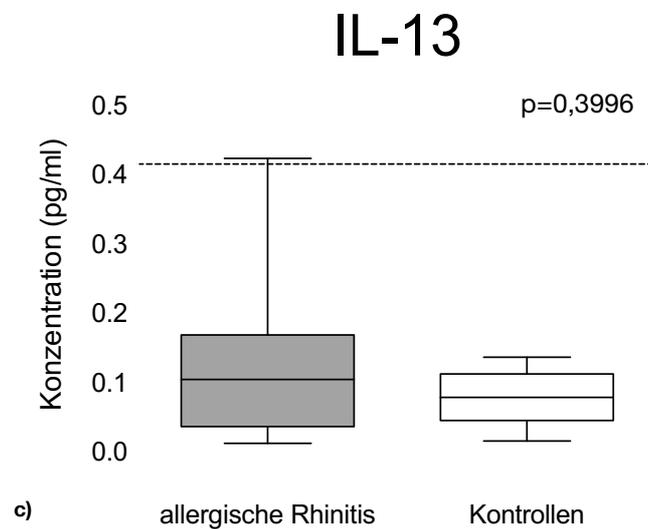
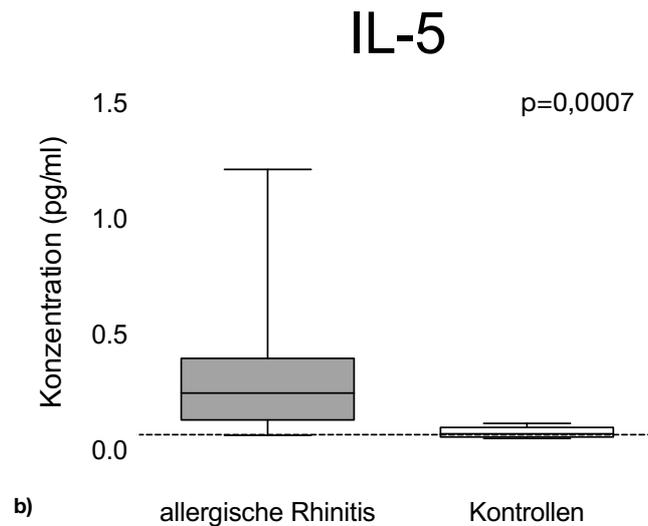


**Abb. 8:** sST2-Konzentrationen in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

### 3.4 IL-4, IL-5 und IL-13

IL-4 fand sich in den Nasenlavagen der Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). Die IL-5-Konzentrationen in den Nasenlavagen waren bei den Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht ( $p = 0,0007$ ). Der Unterschied der IL-13-Konzentrationen war nicht signifikant, jedoch ließ sich eine Tendenz für erhöhte Konzentrationen bei allergischer Rhinitis erkennen. Allerdings befanden sich nahezu alle IL-13-Werte unterhalb des LLOD (Abb. 9; Tabelle 8).



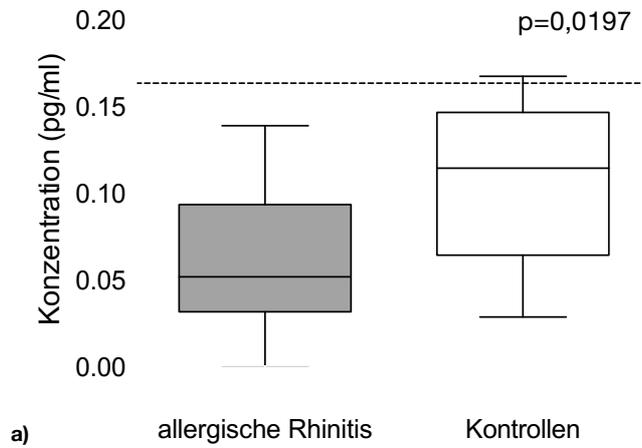


**Abb. 9:** a) IL-4-Konzentrationen, b) IL-5-Konzentrationen und c) IL-13-Konzentrationen in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

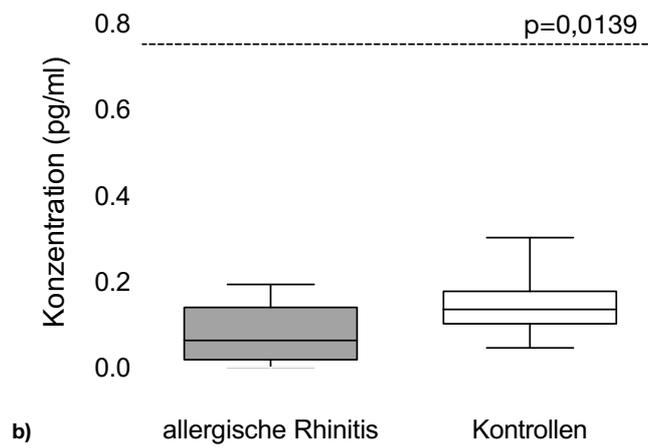
### 3.5 IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$

Sowohl IL-2 als auch IL-12p70 und IFN- $\gamma$  waren bei den Kontrollen signifikant erhöht ( $p=0,0197$ ;  $p=0,0139$ ;  $p=0,0196$ ). Der überwiegende Teil der IL-2-Konzentrationen befand sich unterhalb des LLOD. Ein ähnliches Bild ergab sich für die IL-12p70-Konzentrationen, welche sogar komplett unterhalb des LLOD lagen, und die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Abb. 10; Tabelle 8).

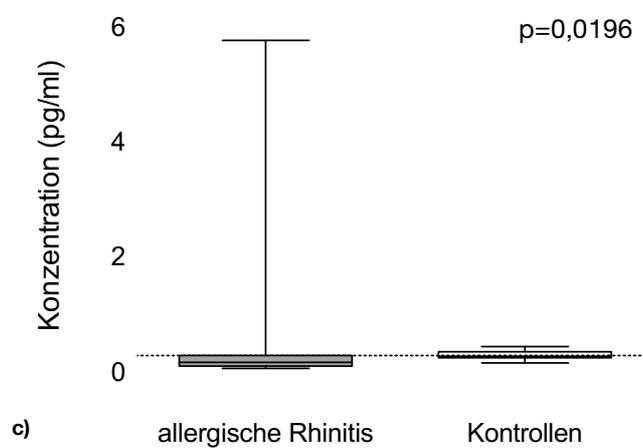
## IL-2



## IL-12p70



## IFN- $\gamma$

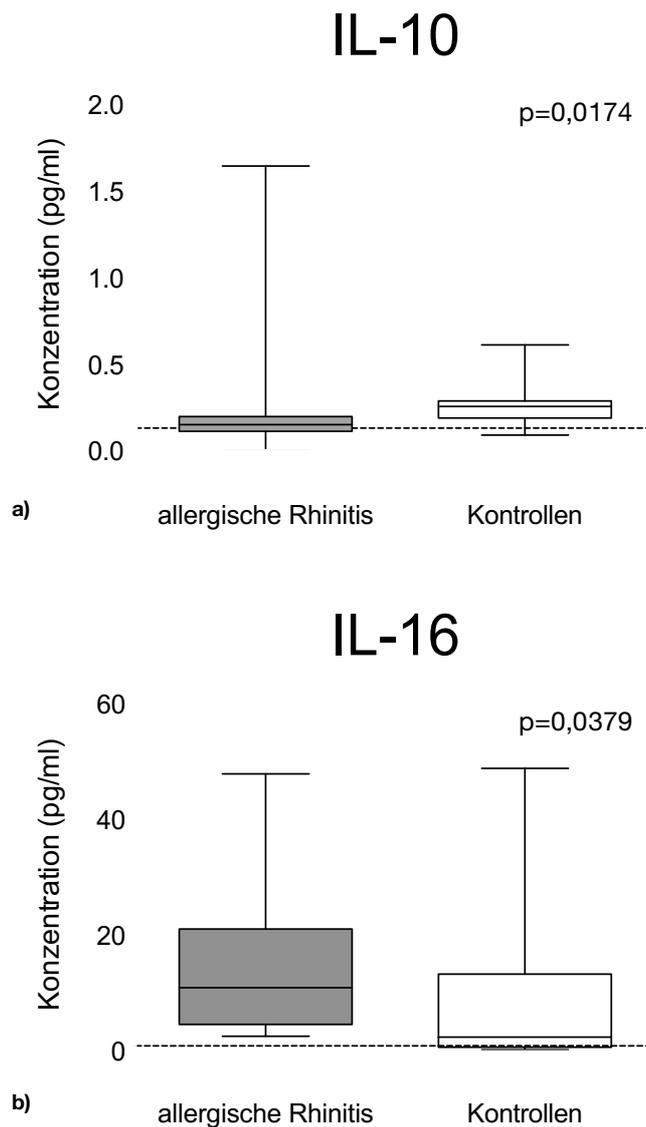


**Abb. 10:** a) IL-2-Konzentrationen, b) IL-12p70-Konzentrationen und c) IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition in Box and Whiskers (Box : Median und

Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

### 3.6 IL-10, IL-16 und IL-17

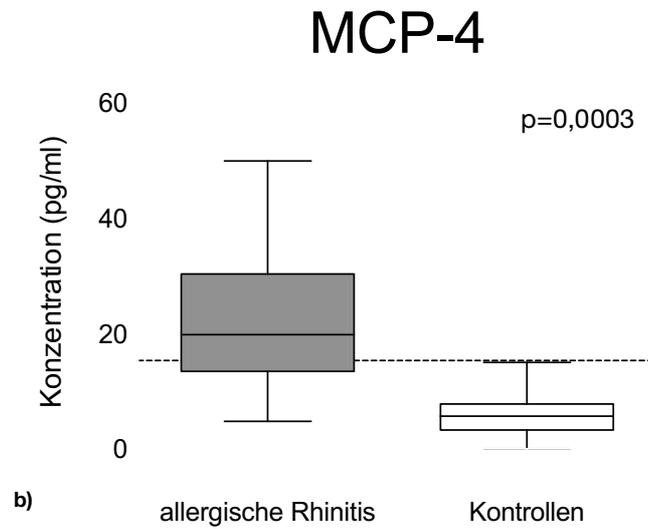
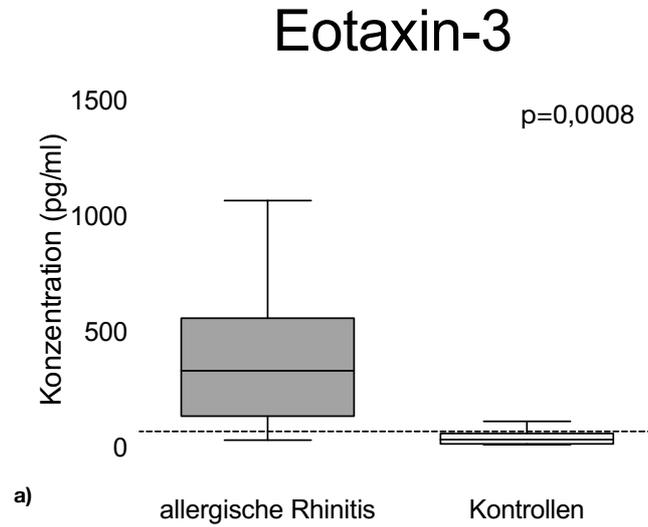
Die IL-10-Konzentrationen waren bei den Kontrollprobanden signifikant erhöht ( $p=0,0174$ ). Die IL-16-Konzentrationen waren bei den Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht ( $p=0,0379$ ) (Abb. 11). Für IL-17 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, wobei sich der Großteil der Werte unterhalb des LLOD befand (Tabelle 8).



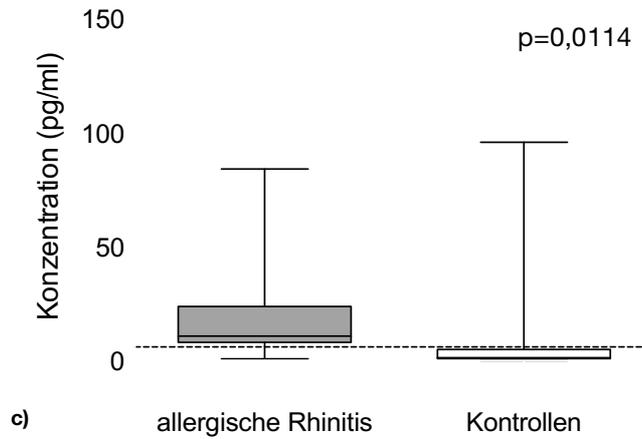
**Abb. 11:** a) IL-10-Konzentrationen und b) IL-16-Konzentrationen in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

### 3.7 Chemokine

Unter den CC-Chemokinen ergaben sich signifikant erhöhte Konzentrationen bei den Probanden mit allergischer Rhinitis für Eotaxin-3 ( $p=0,0008$ ), MCP-4 ( $p=0,0003$ ) und MIP-1 $\beta$  ( $p=0,0114$ ) (Abb. 12; Tabelle 8).



## MIP-1 $\beta$

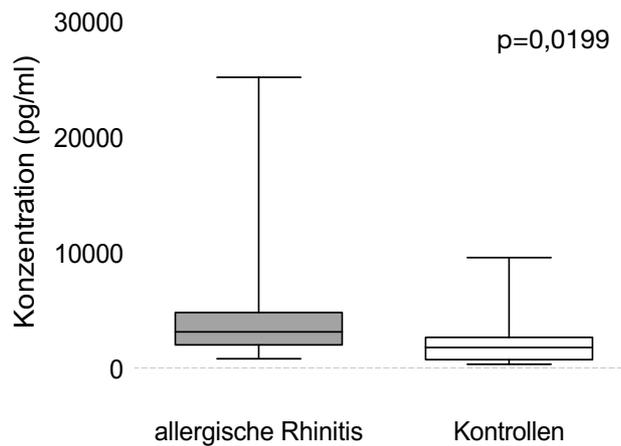


**Abb. 12:** a) Eotaxin-3-Konzentrationen, b) MCP-4-Konzentrationen und c) MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

Die Unterschiede der Chemokine Eotaxin, IP-10, MCP-1, MDC und TARC waren nicht signifikant.

Das CXC-Chemokin IL-8 war bei den Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht ( $p=0,0199$ ; Abb. 13; Tabelle 8).

## IL-8



**Abb. 13:** IL-8-Konzentrationen in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition in Box and Whiskers (Box : Median und Perzentilen (25% und 75%); Whiskers: Minimum und Maximum). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

Botenstoff	Patienten mit allergischer Rhinitis		gesunde Kontrollen		Patienten mit allergischer Rhinitis vs. gesunde Kontrollen (p-Wert)
	Median	Wertebereich	Median	Wertebereich	
Eotaxin	31.73	10.78-96.54	22.28	0.0-95.67	0.2288
Eotaxin-3	327.6	28.4-1064	31.05	7.930-109.4	0.0008
IFN- $\gamma$	0.15	0.05-5.75	0.25	0.14-0.42	0.0196
IL-2	0.052	0.0-0.138	0.114	0.028-0.167	0.0197
IL-4	0.142	0.099-0.306	0.334	0.143-0.596	< 0.0001
IL-5	0.243	0.061-1.21	0.083	0.06-0.112	0.0007
IL-8	3190	851.7-25216	1848	392.7-9603	0.0199
IL-10	0.152	0.0035-1.64	0.258	0.093-0.612	0.0174
IL-12p70	0.063	0.0-0.193	0.135	0.046-0.301	0.0139
IL-13	0.104	0.012-0.423	0.078	0.015-0.136	0.3996
IL-16	10.98	2.58-47.95	2.42 (n=11)	0.25-48.92	0.0379
IL-17	0.04	0-0.335	0.053 (n=11)	0-1,747	0,3361
IL-33	<5.69	im Underflow	<5.69	im Underflow	
IP-10	2517	766.9-28528	2327	335.8-15155	0.4925
MCP-1	68.9	41.3-119.3	76.9	7.7-149.2	0.7812
MCP-4	19.77	4.75-49.83	5.66	0.0-14.95	0.0003
MDC	1.62	0.0-14.8	0.72	0.0-5.06	0.0644
MIP-1 $\beta$	10.83	0.80-84.21	1.35	0.0-95.93	0.0114
sST2	22.74	8.1-61.86	9.05	2.27-29.73	0.0018
TARC	8.16	4.8-35.54	7.97	1.1-25.61	0.0985

**Tabelle 8: Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in Nasenlavage nach natürlicher Allergenexposition.** Alle Werte sind in Picogramm pro Milliliter angegeben. (*underflow* : Das Messergebnis ist unterhalb der Nachweisgrenze der Messung.)

### 3.8 Korrelationen

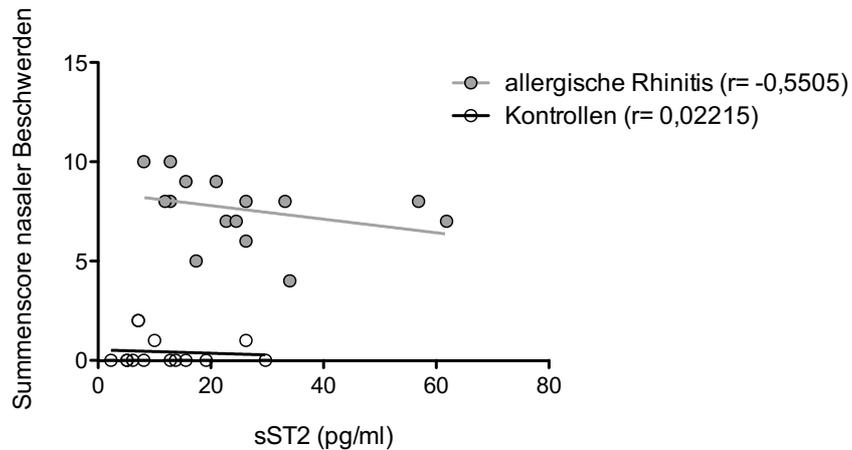
Zur Bestimmung von Korrelationen wurden nur Zytokine verwendet, deren Wertemedian oberhalb des LLOD lag. Unter den gemessenen Zytokinkonzentrationen und erhobenen Parametern der Probanden mit allergischer Rhinitis fanden sich folgende Korrelationen.

#### 3.8.1 Nasale Beschwerden

Die Konzentrationen des sST2 in den Nasenlavagen korrelierten negativ mit den von den Probanden angegebenen nasalen Beschwerden (Spearman  $r = -0,5505$ ,  $p = 0,0335$ ) (Abb. 14).

Für alle weiteren Zyto- und Chemokine ergaben sich keine signifikanten Korrelationen mit den Symptomen.

## Korrelation der nasalen Beschwerden mit sST2



**Abb. 14: Korrelation der nasalen Beschwerden mit sST2;** angegeben ist der Summenscore der nasalen Beschwerden.

### 3.8.2 sST2

Die sST2-Konzentrationen in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis korrelierten mit IL-16 ( $r=0,5581$ ,  $p=0,0306$ ), TARC ( $r=0,542$ ,  $p=0,0369$ ) und IL-8 ( $r=0,6172$ ,  $p=0,0142$ ).

### 3.8.3 IL-5

Die IL-5-Konzentrationen korrelierten mit den Eotaxin-3- ( $r=0,5929$ ,  $p=0,0198$ ) und MCP 4- ( $r=0,6893$ ,  $p=0,0045$ ) Konzentrationen sowie mit den IP-10- ( $r=0,6179$ ,  $p=0,0141$ ) und TARC- ( $r=0,65$ ,  $p=0,0087$ ) Konzentrationen.

### 3.8.4 IL-16

Die IL-16-Konzentrationen korrelierten signifikant mit den Konzentrationen von MCP-4 ( $r=0,6286$ ,  $p=0,0121$ ), MIP-1 $\beta$  ( $r=0,8036$ ,  $p=0,0003$ ) und IL-8 ( $r=0,7286$ ,  $p=0,0021$ ).

### 3.8.5 Chemokine

Neben der Korrelation mit IL-5 korrelierten die Eotaxin-3 und die MCP-4-Konzentrationen auch miteinander ( $r=0,8071$ ,  $p=0,0003$ ). Wie IL-5 korrelierte auch MCP-4 mit TARC ( $r=0,6893$ ,  $p=0,0045$ ) und IP-10 ( $r=0,575$ ,  $p=0,0249$ ). IL-8 korrelierte mit MIP-1 $\beta$  ( $r=0,7786$ ,  $p=0,0006$ ) und mit MCP-1 ( $r=0,5607$ ,  $p=0,0297$ ). Außerdem korrelierte TARC mit MCP-1 ( $r=0,5821$ ,  $p=0,0228$ ). Die Eotaxinkonzentrationen korrelierten mit den Konzentrationen von Eotaxin-3 ( $r=0,5786$ ,  $p=0,0238$ ), MCP-4 ( $r=0,7250$ ,

p=0,0022) und TARC (r=0,5786, p=0,0238). Mit allen weiteren Zyto- und Chemokinen zeigten sich keine Korrelationen.

### **3.8.6 Eosinophilie**

Sowohl Eotaxin-3 (r=0,5916, p=0,0202) und MCP-4 (r=0,6524, p=0,0084) als auch MIP-1 $\beta$  (r=0,5451, p=0,0356) korrelierten mit dem prozentualen Anteil der eosinophilen Granulozyten in den Differentialblutbildern.

## 4. Diskussion

In dieser Studie konnten wir erhöhte Konzentrationen von sST2 und einer Reihe weiterer Zytokine und Chemokine im Nasensekret von symptomatischen Patienten mit allergischer Rhinitis während natürlicher Allergenexposition nachweisen. IL-33 war nicht messbar. In den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis überwogen signifikant die Konzentrationen von IL-5, IL-16, MCP-4, MIP-1 $\beta$  und IL-8 verglichen mit den Kontrollprobanden. Die Nasenlavagen der Kontrollprobanden enthielten jedoch signifikant höhere Konzentrationen IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-12. Unsignifikante Konzentrationsunterschiede ergaben sich für IL-13, IL-17, IP-10, MCP-1, MDC und TARC. Zwischen der Konzentration von sST2 und den Symptomen der Patienten ergab sich eine inverse, signifikante Korrelation. Zwischen mehreren Zytokinen ließen sich ebenfalls signifikante Korrelationen nachweisen.

Die allergische Rhinitis ist charakterisiert durch eine Th2-Zell- assoziierte Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut. Nach der Sensibilisierung kommt es in der Nasenschleimhaut als Reaktion auf jeden weiteren Kontakt mit dem Aeroallergen und durch die Vermittlung freigesetzter Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 zu einem entzündlichen Infiltrat aus hauptsächlich eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Mastzellen. Die freigesetzten Mediatoren, im Besonderen die Zytokine und Histamin, wirken auf Drüsen, Blutgefäße und Nervenenden in der Nasenschleimhaut. Die ersten Symptome wie Juck- und Niesreiz durch die Reizung der Nervenenden und das reflektorische Niesen treten auf. Durch Vasodilatation und eine Steigerung der Kapillarpermeabilität kommt es zum Austritt von Plasma in das umliegende Nasenschleimhautgewebe. Die livid-ödematöse Nasenschleimhaut führt zu nasaler Obstruktion und in Kombination mit gesteigerter glandulärer Sekretion zu Rhinorrhoe.

### 4.1 IL-33 und sST2

Im Zentrum unseres Interesses bei dieser Studie stand die Untersuchung des Zytokins IL-33 und seines löslichen Rezeptors, sST2. Es weist bisher viel darauf hin, dass der IL-33/ST2L Signalweg zumindest eine unterstützende Rolle bei der Entwicklung der allergischen Rhinitis spielt, da IL-33 die Freisetzung Th2- assoziierter Zytokine bewirkt. Für die Allergie relevante Zellen exprimieren den IL-33-Rezeptor ST2L. Dazu gehören dendritische Zellen, Th2-Zellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozy-

ten. Diese Zellen werden durch IL-33 aktiviert [99,114,116-119,123-125,128,129,132-136].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass lösliches ST2 während saisonaler allergischer Rhinitis durch Zellen der Nasenschleimhaut vermehrt freigesetzt wird. Gleichzeitig korrelierten die sST2-Konzentrationen der Probanden mit allergischer Rhinitis negativ mit den nasalen Beschwerden. IL-33 war in den Nasenlavagen nicht messbar.

IL-33 ließ sich weder in Nasenlavagen von Probanden mit allergischer Rhinitis, noch in denen der Kontrollprobanden messen. Ursachen hierfür sind vermutlich die starke Verdünnung des Nasensekrets in der Lavageflüssigkeit und eine dafür zu geringe Empfindlichkeit des ELISA (Nachweisgrenze laut Hersteller 4,14 pg/ml). Grundsätzlich scheinen nasale Epithelzellen fähig zu sein, IL-33 zu bilden. Kamekura et al. konnten eine gesteigerte Expression von IL-33 mRNA in humanen nasalen Epithelzellen feststellen. Allerdings waren sie nicht in der Lage IL-33 mittels ELISA im Überstand der kultivierten und mit IFN $\gamma$  stimulierten Zellen zu detektieren [3]. Durch die direkte Aspiration von Nasensekret, welches im Zuge der Aliquotierung zweifach verdünnt wurde, ist es Asaka et al. 2012 gelungen, mittels ELISA signifikant erhöhte IL-33-Konzentrationen in den Nasensekreten von Patienten mit allergischer Rhinitis während der Allergiesaison zu messen. Diese korrelierten positiv mit dem nasalen Symptomscore [154]. Dieser Zusammenhang ergänzt sehr gut die negative Korrelation zwischen sST2 und den nasalen Beschwerden, da sST2 als löslicher IL-33-Rezeptor die IL-33-Wirkung antagonisieren kann. Führt also höhere lokale Konzentrationen von IL-33 zu einer Verstärkung der nasalen Symptome, indem sie die Entzündungsreaktion förderten, so wäre gut vorstellbar, dass die Stärke der nasalen Symptome mit zunehmender sST2-Konzentration abnimmt.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass sich nach Allergenprovokation neben sehr hohen nasalen sST2-Mengen nur sehr niedrige IL-33-Mengen messen ließen [200]. Ob eine im Vergleich zu IL-33 mehrfach höhere Konzentration des löslichen Rezeptors als natürlicher Regulationsmechanismus gegen das Fortschreiten der Entzündung dient, muss in weiteren Studien untersucht werden. IL-33 wäre als Zytokin, dessen löslicher Rezeptor oder Antagonist in stark erhöhter Konzentration in Körpersekreten vorliegt, in Gesellschaft anderer Zytokine, wie zum Beispiel des RANK-Liganden (RANKL). Osteoprotegerin (OPG) bindet RANKL und vermindert so dessen Wirkung auf Osteoklasten. In Speichelproben war OPG dabei bis zu 30-fach höher konzentriert als RANKL [201-203]. Ein anderes Beispiel ist IL-1 $\beta$ . Die Konzentration des IL-1-Rezeptorantagonisten

(IL-1Ra) in Nasensekreten nach nasaler Provokation war sogar 1000-fach höher als die von IL-1 $\beta$  [204].

In dieser Studie konnten wir erstmals nachweisen, dass die sST2-Konzentrationen in Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis nach natürlicher Allergenexposition verglichen mit den Nasenlavagen der Kontrollprobanden signifikant erhöht waren. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass lösliches ST2 als Reaktion auf die Exposition mit natürlichen Mengen allergener Pollen vermehrt in der Nasenschleimhaut freigesetzt wird. Gemäß den beschriebenen Funktionen von ST2 könnte es auch lokal in der Nase IL-33 blockieren und so die allergische Entzündung dämpfen [92,148]. Eine vergleichbare Untersuchung der nasalen sST2-Konzentrationen wurde bisher nicht veröffentlicht.

Es wurden jedoch Studien veröffentlicht, die sST2-Konzentrationen im Serum verglichen. Diese Untersuchungen von Patienten mit allergischer Rhinitis ergaben im Vergleich mit Kontrollprobanden entweder keine signifikanten Unterschiede oder eine signifikante Erhöhung des sST2 auf Seiten der Patienten mit allergischer Rhinitis. Dabei wurden keine signifikanten Korrelationen mit der Symptomstärke nachgewiesen [153,155]. Serumveränderungen sind für die allergische Rhinitis allerdings weniger relevant als die lokalen Zytokinkonzentrationen, da die lokalen Mediatoren die Zellzusammensetzung in der Nasenschleimhaut beeinflussen und zu den typischen Symptomen führen.

Im Serum von Patienten mit Asthma bronchiale, welches ebenfalls eine Erkrankung des atopischen Formenkreises darstellt, fanden sich signifikant höhere sST2-Konzentrationen als in Kontrollseren. Die Konzentrationen korrelierten jedoch nur im akuten Asthmaanfall auch mit der Schwere des Asthmaanfalls, nicht mit der Schwere des Asthmas im Allgemeinen. Während der akuten Exazerbation des Asthma bronchiale stiegen die sST2-Serumspiegel weiter an. Gleichzeitige Messungen der IL-33-Serumkonzentrationen wurden jedoch nicht durchgeführt. Interessant ist auch, dass die Eosinophilenzahlen negativ mit den sST2-Serumkonzentrationen während des akuten Asthmaanfalls korrelierten [151,205]. Jedoch ist die sST2-Konzentration bisher weder in Lungenbiopsien noch in bronchoalveolären Lavagen von Asthmapatienten untersucht worden. Ein erster Ansatz in der Erforschung der lokalen sST2-Konzentrationen im Rahmen des Asthma bronchiale findet sich in einem murinen Asthmodell. Kurokawa et al. konnten dabei, nach einer inhalativen Provokation mit Ovalbumin, die verstärkte Expression von sST2 mRNA und Protein in Lungengewebe nachweisen [206].

Die negative Korrelation zwischen der nasalen sST2-Konzentration während allergischer Rhinitis und der Stärke der nasalen Beschwerden gibt einen Anhalt für die entzün-

dungsdämpfende Funktion des nasalen sST2 im Rahmen der allergischen Rhinitis. Studien an genetisch veränderten Mäusen zeigen sehr gegensätzliche Ergebnisse bezüglich der Rolle des IL-33/ST2 Signalwegs für die allergische Rhinitis. Dabei führte die Abwesenheit von ST2 bei Mangan et al. zu einer Verstärkung und bei Townsend et al. zu einer Abschwächung der Th2-Antwort. Untersuchungen von Hoshino et al. aus dem Jahr 1999 ergaben sogar, dass ST2 keine wesentliche Rolle für die Th2- und Mastzellfunktion spielte [207-209]. Studien am Mausmodell weisen auf ein therapeutisches Potential von IL-33-Antikörpern für atopische Erkrankungen hin [210,211]. SST2 könnte demnach auch einen therapeutischen Effekt besitzen, indem es IL-33 blockiert [148]. Nichtsdestotrotz sind weitere Untersuchungen der humanen allergischen Rhinitis notwendig, da Mausmodelle oft das Verhalten der zu untersuchenden inflammatorischen Erkrankungen des Menschen nicht ausreichend widerspiegeln [212].

## **4.2 T-Lymphozyten**

### **4.2.1 Th2-Zytokine: IL-4, IL-5 und IL-13**

Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sind wesentliche Botenstoffe für die Entwicklung der allergischen Rhinitis. Für IL-4 und IL-13 konnte dies jedoch in unserer Studie nicht in Form signifikanter Erhöhungen in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis bestätigt werden.

Im Gegenteil: in den Nasenlavagen der Kontrollgruppe ließen sich signifikant höhere IL-4-Konzentrationen messen. Dies war ein überraschendes Ergebnis, denn in verschiedenen vorhergehenden Studien wurden signifikant höhere IL-4-Konzentrationen in den Nasensekreten von Probanden mit allergischer Rhinitis gefunden [213-215]. Benson et al. gewannen 1996 in Schweden Nasenlavagen von Jugendlichen mit allergischer Rhinitis sowie von gesunden Jugendlichen vor und während der Allergiesaison. Die Durchführung der Nasenlavage unterschied sich jedoch von der in dieser Studie angewandten Technik. Physiologische Kochsalzlösung wurde mittels Sprühapplikator in die Nase eingebracht und unmittelbar passiv wieder heraus laufen gelassen, wobei mehrere Sprühstöße nötig waren, um die gewünschte Probenmenge zu gewinnen. Sie untersuchten die Nasenlavagen mittels ELISA. Gegensätzlich zu unserer Studie ergab sich dabei eine signifikante Erhöhung der IL-4-Konzentration in den Nasenlavagen der Patienten mit allergischer Rhinitis innerhalb der Allergiesaison und verglichen mit den Kontrollprobanden. Ein wichtiger Unterschied zu unserer Studie ist jedoch, dass die Patienten der Studie von Benson et al. nicht aufgefordert wurden, ihre antiallergische Medikation für festgelegte Zeiträume vor der Probenentnahme abzusetzen. Da der Pollenflug 1996 in Schweden sehr stark war, ist davon aus-

zugehen, dass die Medikation von den meisten Patienten durchgehend eingenommen wurde, was zu einer Veränderung des nasalen Zytokinmilieus geführt haben kann [216].

Auch in Provokationsstudien unserer eigenen Arbeitsgruppe wurden in Nasensekreten von Probanden mit allergischer Rhinitis signifikante Erhöhungen von IL-4 nach Allergenprovokation gemessen [204,217].

Chawes et al. haben 2010 die Ergebnisse ihrer Untersuchungen von Nasensekreten, die mit Hilfe eines synthetischen absorbierenden Materials auf der Nasenschleimhaut gewonnen worden waren, veröffentlicht. Die Proben wurden mit Hilfe des gleichen Elektrolumineszenz-Versuches wie in unserer Studie untersucht. Das Ergebnis für IL-4 war nicht signifikant. Die Mediane der Patientengruppe und der Kontrollprobandengruppe waren gleich (0,1pg/ml). Allerdings erreichte der Wertebereich der Kontrollen mit 0,05-0,8 pg/ml höhere Werte als der Wertebereich der Probanden mit allergischer Rhinitis mit 0-0,3 pg/ml. Insgesamt bewegen sich die IL-4-Konzentrationen aus unserer Studie und der Studie von Chawes et al. in gleichen Dimensionen [218]. Diese Daten stellen die Zuverlässigkeit der gewählten Nachweismethode für dieses Zytokin in Frage.

Gröger et al. veröffentlichten 2012 eine Studie, in der sie mittels eines auf Fluoreszenz basierenden, humanen Cytokin 17-plex Assays unter anderem IL-4 in Nasensekreten von Rhinitispatienten und gesunden Kontrollprobanden maßen. Dabei verglichen sie die perenniale allergische Rhinitis mit der nicht-allergischen Rhinitis mit eosinophilem Syndrom, welche über einen negativen Skin-Prick-Test und hohe ECP (eosinophiles kationische Protein) Konzentrationen in den Nasensekreten, unter Ausschluss des Vorliegens anderer sinunasaler Erkrankungen, definiert worden war. Die Nasensekrete wurden mit absorbierender Watte aus dem mittleren Nasengang gewonnen. Es stellte sich heraus, dass die IL-4-Konzentrationen in den Nasensekreten der Patienten mit nicht-allergischer Rhinitis signifikant gegenüber derer der Kontrollgruppe erhöht waren. Allerdings fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollprobanden und den Patienten mit perenniale allergischer Rhinitis [219].

IL-4 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Th2-Immunantworten. Nichtsdestotrotz scheint sich die Th2-Immunantwort auch ohne IL-4 ausbilden zu können. IL-4 wird hauptsächlich von Th2-Zellen [220,221] und Mastzellen [222,223] produziert. Doch ist schon seit Längerem bekannt, dass nicht nur IL-4 in der Lage ist Th2-Immunantworten zu induzieren [224]. Am Mausmodell zeigte sich, dass eine starke Einschränkung der Fähigkeit CD4<sup>+</sup> T-Zellen IL-4 zu produzieren, keine Auswirkung auf die Produktion anderer Th2-Zytokine zu haben scheint [225]. So sind heute neben IL-33 auch IL-25 und TSLP als Zytokine bekannt, die die Th2-Immunantwort fördern [226]. Die Anwesenheit von IL-25 und IL-33 stimuliert zum Beispiel eine erst seit wenigen Jahren ge-

nauer beschriebene Zellart, die Nuozyten [227]. Diese Zellen produzieren daraufhin vermehrt IL-5 und IL-13, jedoch nicht IL-4. Die Relevanz von Nuozyten für die allergische Entzündung wird zur Zeit immer öfter diskutiert und bleibt bis auf Weiteres offen [228-231].

Außerdem konnten Kurowska-Stolarska et al. zeigen, dass mit CD3-Antikörpern aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus humanem Nabelschnurblut nach IL-33 Stimulation signifikant höhere Mengen an IL-5 und IL-13, jedoch nicht an IL-4 oder IFN- $\gamma$  produzierten [123].

Diese Ergebnisse zeigen, dass nasale IL-4-Konzentrationen während allergischer Rhinitis nicht unbedingt erhöht sein müssen, erklären jedoch nicht die signifikante Erhöhung der IL-4-Konzentration in den Nasenlavagen der Kontrollprobanden. Allerdings können IL-4-Konzentrationen und Messmethoden von multiplen Faktoren beeinflusst werden. Die signifikant erhöhte Expression von IL-4-Rezeptoren auf Zellen der Nasenschleimhaut nach Allergenprovokation bei allergischer Rhinitis stellt einen dieser Faktoren dar [232]. Neben den membranständigen IL-4-Rezeptoren gibt es auch lösliche IL-4-Rezeptoren. Die Affinität von IL-4 zu seinem membrangebundenen Rezeptor ist höher als die zu seinem löslichen Rezeptor. Die löslichen Rezeptoren scheinen in Nasensekreten von gesunden Kontrollprobanden verglichen mit Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis generell erhöht zu sein. Bei Probanden mit allergischer Rhinitis kommt es jedoch innerhalb der Saison nasal zu einem sIL-4R-Anstieg [233,234].

Des Weiteren ist eine alternative Splicingvariante von IL-4 bekannt, IL-4 $\delta$ 2, welche IL-4 regulierende Wirkung zu besitzen scheint und dessen Rolle für allergische Erkrankungen noch nicht vollends geklärt ist [235-237]. Es ist möglich, dass der Elektrochemilumineszenz-Versuch, der zur Messung der Zyto- und Chemokine verwendet wurde, nicht zwischen IL-4 und seiner Splicingvariante unterscheiden kann.

Aus der Vielzahl an beeinflussenden Faktoren ergibt sich eine Komplexität, die in Zukunft weitere und umfassendere Untersuchungen dieses wichtigen Th2-Zytokins erfordern.

Die IL-13-Konzentrationen zeigten in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied. Allerdings ließ sich ein Trend zu höheren IL-13-Konzentrationen in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis erkennen. Dabei lagen nahezu alle gemessenen Werte unter der Nachweisgrenze (genauer unter dem *lower limit of detection*, LLOD). Schon vor Jahren wurde gezeigt, dass IL-13 bei allergischen Erkrankungen auch im Serum erhöht ist. Dies wurde als Argument für die systemische Natur der allergischen Entzündung der Nase benutzt. Die Plasmakonzentrationen von Patienten mit allergischem Asthma waren verglichen mit gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht [238].

In einigen Studien hatte man periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis und von Kontrollprobanden mit Allergenen stimuliert und danach die IL-13-Konzentrationen in den Zellüberständen gemessen. Die IL-13-Konzentrationen in den Zellüberständen der PBMCs der Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis stiegen im Vergleich signifikant stärker an [239,240].

Obwohl IL-13 zu den klassischen Th2-Zytokinen gehört, stand es in Untersuchungen über Zytokinkonzentrationen während der saisonalen allergischen Rhinitis oft eher im Hintergrund, weshalb es nur wenige Veröffentlichungen darüber gibt. Nach nasalen Allergenprovokationen kam es zu deutlich verstärkter Expression von IL-13 mRNA in Zellen der Nasenschleimhaut [241,242]. Erin et al. führten bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis Nasenlavagen vor und nach nasaler Allergenprovokation durch. Im Unterschied zu unserer Studie erfolgte die Lavage mit körperwarmer phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) für 30 Sekunden. Unter zuvor mit Placebo therapierten Probanden fand sich etwa sechs Stunden nach der Allergenprovokation der Höhepunkt des allergeninduzierten IL-13-Konzentrationsanstiegs [243]. In einer früheren Provokationsstudie unserer Arbeitsgruppe konnten wir ebenfalls einen IL-13-Konzentrationsanstieg in Nasensekreten mit dem Höhepunkt fünf Stunden nach der Allergenprovokation zeigen [244].

Die Veröffentlichung von Chawes, in der IL-13 in Nasensekreten während allergischer Rhinitis gemessen wurde, bestätigt, was sich in unserer Untersuchung unterhalb des LLOD nur andeutet. Das nasale IL-13 war in den Proben der Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant höher konzentriert [218]. Gröger et al., die auch Nasensekrete untersuchten, fanden ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den IL-13-Konzentrationen der Nasensekrete der Kontrollprobanden und denen der Patienten mit allergischer Rhinitis [219].

Die IL-5-Konzentrationen in den Nasenlavagen waren bei den Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht. Benson et al. untersuchten ebenfalls IL-5. In ihrer Studie stellten sie fest, dass sich sowohl bei Patienten mit allergischer Rhinitis als auch bei den Kontrollprobanden die nasalen IL-5-Konzentrationen innerhalb der Saison erhöhten. Nach ihren Messungen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen innerhalb der Allergiesaison. Demnach könnte ein Kritikpunkt an unserer Studie der zeitliche Abstand zwischen der Probengewinnung der Probanden mit allergischer Rhinitis von Mai bis Juni 2010 und der der Kontrollprobanden von August bis November 2010

sein. Um dies zu entkräften, wäre jedoch eine weitere Studie, in der der besagte zeitliche Abstand nicht besteht, erforderlich.

Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 1995 zeigte keine signifikanten Unterschiede in der IL-5 mRNA Expression zwischen Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis und gesunden Kontrollprobanden [245]. Dagegen sprechen allerdings andere Veröffentlichungen, wie zum Beispiel die von Durham et al. aus dem Jahr 1992. 24 Stunden nach nasaler Allergenprovokation war die IL-5 mRNA Expression in der Nasenschleimhaut signifikant gegenüber der nach Provokation mit einer Kontrolllösung erhöht [51]. Masuyama et al. stellten Entsprechendes fest, als sie die IL-5 mRNA Expression außerhalb der Saison mit der innerhalb der Saison verglichen. Die Anzahl der IL-5 mRNA exprimierenden Zellen stieg in den Nasenschleimhautbiopsien der Patienten, die während der Saison nur ein Placebo-Nasenspray verwendeten, signifikant an. Im Gegensatz dazu waren die Veränderungen in der Pollensaison nach Verwendung von Fluticason-Nasensprays nicht signifikant [246]. Die IL-5 mRNA Expression scheint demnach im Rahmen einer allergischen Rhinitis anzusteigen.

Eine Reihe von Veröffentlichungen haben gezeigt, dass IL-5 in Nasensekreten von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis auch vermehrt freigesetzt wird. In Nasensekreten von 24 Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis und acht gesunden Kontrollprobanden wurden von Kramer et al. die IL-5-Konzentrationen mittels ELISA gemessen. Die Nasensekrete wurden mittels Baumwollplättchen gewonnen, welche für fünf Minuten in die vordere Nasenhaupthöhle eingelegt worden waren. Die IL-5-Konzentrationen in den Nasensekreten der Patienten mit allergischer Rhinitis waren gegenüber denen der Kontrollprobanden signifikant erhöht [247]. Im Rahmen einer Studie, in der der Zusammenhang zwischen der Symptomstärke bei allergischer Rhinitis, nasaler Eosinophileninfiltration und Zytokinzusammensetzung untersucht wurde, haben Ciprandi et al. auch IL-5 in Nasenlavagen mittels ELISA gemessen. Die IL-5-Konzentrationen der Nasenlavagen der Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis waren signifikant höher als die der Kontrollprobanden. Obwohl die Messmethode für IL-5 in dieser Studie eine andere war, kommt das Verfahren der Nasenlavage dem in unserer Studie angewandten sehr nah. Die Konzentrationsbereiche aus der Veröffentlichung von Ciprandi et al. bewegen sich jedoch in höheren Dimensionen [214,248]. Chawes et al., die die Zytokinkonzentrationen aus Nasensekreten einer Gruppe allergischer Rhinitis Patienten mit einer Gruppe Kontrollprobanden verglichen hatten, stellten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der IL-5-Konzentrationen auf Seiten der Patienten mit allergischer Rhinitis fest. Sie verwendeten den gleichen Elektro-

chemilumineszenz-Versuch, der auch in unserer Studie genutzt wurde. Die Nasensekrete wurden hier nicht durch Nasenlavagen gewonnen, sondern mit Hilfe eines synthetischen, absorbierenden Streifens, der auf die Nasenschleimhaut aufgelegt wurde [218]. Die IL-5-Ergebnisse von Gröger et al. stimmen damit überein, da die IL-5-Konzentrationen in den Nasensekreten der Patienten mit perennialer allergischer Rhinitis ebenfalls signifikant höher waren [219].

In den Provokationsstudien von Erin et al. hat sich im Vergleich zwischen steroidtherapierten und placebotherapierten Patienten mit allergischer Rhinitis gezeigt, dass die IL-5 Antwort nach nasaler Allergenprovokation durch vorige Steroidgabe abgeschwächt werden kann. Die Gabe von Placebo verhinderte einen Anstieg der IL-5-Konzentrationen in den Nasenlavagen nicht [215,243]. Provokationsstudien unserer Arbeitsgruppe bestätigen diesen IL-5-Anstieg bereits wenige Stunden nach der nasalen Provokation [200]. Die IL-5-Ergebnisse unserer Studie bestätigen daher die in vorhergehenden Untersuchungen entwickelten Theorien der Relevanz der IL-5 Freisetzung durch Zellen der Nasenschleimhaut für die Entwicklung und den Verlauf einer allergischen Rhinitis.

#### **4.2.2 Th1-Zytokine: IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$**

Die IL-2-, IL-12p70- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen waren in den Nasenlavagen der Kontrollprobanden signifikant erhöht. Dabei befand sich der Großteil aller gemessenen Konzentrationen jedoch unterhalb des LLOD. Diese Ergebnisse passen sehr gut in das bestehende Bild der Imbalance zwischen Th2- und Th1-Zytokinen bei der allergischen Rhinitis. In der Spätreaktion der allergischen Rhinitis kommt es demnach in Folge der Th2-Zellaktivierung in der Nasenschleimhaut zu einem Anstieg der Zellen, die die mRNA Th2-assoziierter Zytokine, jedoch nicht Th1-assoziierter Zytokine, exprimieren [51].

Benson et al. fanden in ihrer 1997 veröffentlichten Studie heraus, dass in Nasenlavagen von gesunden Kontrollprobanden die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen innerhalb der Pollensaison sehr stark ansteigen. Währenddessen blieben die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in den Nasenlavagen der Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis vor und in der Saison fast unverändert. Dadurch lagen die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der Kontrollgruppe innerhalb der Pollensaison signifikant über denen der Gruppe mit allergischer Rhinitis [216]. Dies hat sich auch in den Untersuchungen der Nasenlavagen von Ciprandi et al. aus dem Jahr 2004 bestätigt [214].

Andere vergleichende Untersuchungen erbrachten zwar keine signifikanten Unterschiede der IL-2, IL-12p70- oder IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Nasensekreten von Probanden

mit allergischer Rhinitis im Vergleich mit Kontrollprobanden, allerdings ließen sich ähnliche Tendenzen erkennen [213,218]. Die Veröffentlichung von Erin et al. aus dem Jahr 2005 ist eine der wenigen, in denen IL-2, IL-12p70 und IFN- $\gamma$  in Nasensekreten und Nasenlavagen von Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis nach einer nasalen Provokation bestimmt wurden. Die Konzentrationen aller drei Zytokine zeigten im Verlauf nach der Provokation keine signifikanten Veränderungen. Dahingegen zeigten die Th2-Zytokine, IL-4, IL-5 und IL-13, signifikante Konzentrationsanstiege nach der nasalen Allergenprovokation [215]. Außerdem wurde IFN- $\gamma$  in den Zellüberständen allergenstimulierter PBMCs gemessen. In den Zellüberständen von PBMCs nicht atopischer Patienten waren die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen signifikant erhöht verglichen mit Zellüberständen von PBMCs atopischer Patienten [249]. Ähnliche Ergebnisse haben die Untersuchungen von allergenspezifischen Th-Lymphozyten hervorgebracht. Allergenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von nicht atopischen Individuen produzierten IFN- $\gamma$  jedoch kein bzw. kaum IL-4, während allergenspezifische T-Lymphozyten von atopischen Individuen IL-4 bildeten, jedoch kein IFN- $\gamma$  [250,251].

Studien zur spezifischen Immuntherapie (SIT) untermauern die Imbalance zwischen Th1- und Th2-Zytokinen bei Patienten mit allergischer Rhinitis zusätzlich. Während der allergenspezifischen Immuntherapie wird das Immunsystem des Patienten mit einer zunehmenden Dosis des Allergens konfrontiert, gegen das der Patient allergisch ist. Ziel ist es, dass sich eine Immuntoleranz gegen das Allergen entwickelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Immuntherapie der allergischen Rhinitis zu lokalen Veränderungen der Zytokinverhältnisse führt. Die Zellen, die IFN- $\gamma$  mRNA produzierten, fanden sich signifikant vermehrt in der Nasenschleimhaut von immuntherapierten Patienten verglichen mit Placebogruppen [252,253].

#### **4.2.3 Das regulatorische T-Zell-Zytokin: IL-10**

Angesichts gegenwärtiger Fragestellungen über den Zusammenhang zwischen Immuntoleranz und IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen ist das Ergebnis der IL-10-Konzentrationen auf allergisch entzündeter Nasenschleimhaut besonders interessant.

Im Gegensatz zu den wenigen zuvor veröffentlichten Untersuchungen, in denen nasale IL-10-Konzentrationen von Gesunden mit denen von Probanden mit allergischer Rhinitis verglichen wurden, zeigten sich in unserer Studie erstmals erhöhte IL-10-Konzentrationen in den Nasenlavagen gesunder Kontrollprobanden. In diesem Punkt unterscheiden sich unsere Ergebnisse von denen von Benson et al.. Die IL-10-

Konzentrationen waren in den Nasensekreten der Jugendlichen mit saisonaler allergischer Rhinitis während der Pollensaison signifikant höher als in den Nasensekreten der gesunden Jugendlichen [216]. In Nasensekreten, die mit Hilfe einer zwischen unterer Nasenmuschel und Septum geklemmten Gaze gewonnen worden waren, wurden von Scavuzzo et al. ZytokinKonzentrationen mittels ELISA gemessen. Die nasalen IL-10-Konzentrationen der Patienten mit allergischer Rhinitis lagen dabei signifikant über denen der Kontrollprobanden. Es muss erwähnt werden, dass im Unterschied zu unserer Studie, neben intermittierender auch persistierende symptomatische allergische Rhinitis untersucht wurde [213]. In den Untersuchungen von Chawes et al. ergaben sich im Vergleich der Nasensekrete von Kindern mit allergischer Rhinitis mit denen gesunder Kinder keine signifikanten Unterschiede [218].

Akdis et al. konnten eine erhöhte Anzahl allergenspezifischer IL-10 produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den PBMCs nicht atopischer Probanden im Vergleich mit atopischen Probanden nachweisen. Diese IL-10 produzierenden T-Zellen waren in der Lage IL-4 produzierende allergenspezifische T-Zellen zu hemmen. Dieser hemmende Effekt war durch die Blockade von IL-10 und TGF- $\beta$  rückgängig zu machen [89]. Es handelte sich um regulatorische T-Zellen, genauer um Tr1-Zellen.

In der Nasenschleimhaut kann IL-10 nicht nur von T-Lymphozyten sondern auch von Epithel- und Endothelzellen produziert werden. Muller et al. veröffentlichten 2007 eine Provokationsstudie, in der sie die IL-10 Expression in Nasenschleimhautbiopsien von Patienten mit Hausstaubmilbenallergie und Kontrollprobanden nach nasaler Allergenprovokation verglichen. Die IL-10 Expression war in den differenzierten Epithelschichten der Nasenschleimhautbiopsien der Patienten mit allergischer Rhinitis 24 Stunden nach der Allergenprovokation signifikant hochreguliert. Je weniger IL-10 jedoch vor der nasalen Provokation exprimiert worden war, desto stärker waren die nasalen Symptome, wie Rhinorrhoe [254,255]. Zusammengenommen könnten die erhöhten IL-10-Konzentrationen in den Nasenlavagen der Kontrollgruppe, die wir feststellen konnten, eine Suppression der Th2-Zellen mitbewirkt haben. Dies könnte mit ein Grund dafür sein, dass diese gesunden Kontrollprobanden eben nicht sensibilisiert sind.

#### **4.2.4 Das Th17-Zytokin: IL-17**

Der Unterschied der IL-17-Konzentrationen in den Nasenlavagen beider Gruppen war nicht signifikant. Zudem befanden sich die meisten Werte unterhalb der Nachweisgrenze (LLOD).

Es war wichtig die IL-17-Konzentrationen zu messen, da in jüngster Vergangenheit begonnen wurde, auch die potentielle Rolle der Th17-Zellen für die allergische Rhinitis zu diskutieren. Neben den Veröffentlichungen von Ciprandi et al. über den Zusammenhang erhöhter, systemischer IL-17-Konzentrationen und erhöhter Anzahlen CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T-Zellen bei Birkenpollenallergikern mit der Symptomstärke der allergischen Rhinitis [66,67,69], gibt es kaum Studien, die die nasalen IL-17-Konzentrationen beleuchten. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer Provokationsstudie einen signifikanten Anstieg der nasalen IL-17-Konzentrationen besonders fünf Stunden nach der nasalen Provokation feststellen [217]. Die unsignifikanten Ergebnisse der Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition entsprechen dem nicht. Allerdings fanden auch Klemens et al. in ihren 2007 veröffentlichten Untersuchungen von Nasensekreten keine signifikanten Unterschiede der IL-17-Konzentrationen. Sie verglichen Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis während der Saison mit gesunden Kontrollprobanden [71]. Außerdem ließ sich in Nasenschleimhautproben von Patienten mit allergischer Rhinitis keine signifikant höhere IL-17 Expression feststellen als in Nasenschleimhautproben von Kontrollprobanden [72]. Über die Relevanz der IL-17 Expression für die allergische Rhinitis herrscht weiterhin Unklarheit. Die bisher erzielten Ergebnisse sollten jedoch dazu anregen, der Rolle dieses Zytokins und der Th17-Zellen im Zusammenhang mit allergischer Rhinitis weiter auf den Grund zu gehen.

#### **4.2.5 Ausblick: T-Lymphozyten**

Gegenwärtig ist das in dieser Studie gemessene Th2-Zytokinprofil der Nasenlavagen nur teilweise nachvollziehbar. Es ist wahrscheinlich, dass die chronisch niedrigdosierte, natürliche Allergenexposition ein anderes Zytokinprofil hervorruft, als zum Beispiel eine hoch dosierte, nasale Allergenprovokation. In der unmittelbaren Vergangenheit wurden zunehmend mehr T-Helfer-Zellarten benannt und aktuell wird versucht diese zu definieren. In Anbetracht dessen ist es wahrscheinlich, dass sich das bekannte Spektrum der T-Zell-Immunantworten in Zukunft weiter verändern und noch erweitern wird. Außerdem unterstützen unsere Ergebnisse die Theorie, dass weitere Einflussfaktoren wie das IL-33 mit seinem löslichen Rezeptor eine Rolle für die Entwicklung allergischer Nasenschleimhautreaktionen spielen. Wie wichtig diese Rolle wäre, könnte ebenfalls von Dauer und Intensität der Allergenexposition abhängen.

### 4.3 IL-16

Das Ergebnis, dass die IL-16-Konzentrationen bei den Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht waren, unterstützt vorhergegangene Veröffentlichungen über IL-16 im Zusammenhang mit allergischer Rhinitis.

Für eine Doppelblindstudie untersuchten Pullerits et al. Nasenschleimhautbiopsien der unteren Nasenmuscheln von 16 Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis und fanden dabei außerhalb der Pollensaison signifikant mehr IL-16-positive Zellen als in den Nasenschleimhautbiopsien der fünf gesunden Kontrollprobanden. Während der darauffolgenden Saison erhielten acht Patienten mit allergischer Rhinitis ein nasales Glukokortikoid und acht ein nasales Placebo. Nachdem erneut Biopsien von den Patienten gewonnen worden waren, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-16 Expression in den Biopsien der mit Placebo therapierten verglichen mit den steroidtherapierten Patienten. Allerdings fehlte der erneute Vergleich mit Nasenschleimhautbiopsien der Kontrollprobanden innerhalb der Saison [197]. Karaki et al. entnahmen für ihre 2005 veröffentlichte Studie ebenfalls Nasenschleimhautbiopsien in einer vergleichsweise großen Studienpopulation. Diese bestand aus 48 Patienten mit allergischer Rhinitis, davon 20 mit saisonaler allergischer Rhinitis als Reaktion auf Pollen der japanischen Zeder, und 21 gesunden Kontrollprobanden. Die Biopsien wurden immunhistochemisch untersucht. In den Nasenschleimhautbiopsien der Kontrollprobanden konnten Karaki et al. keine IL-16 Expression feststellen. Neben IL-16 exprimierenden Immunzellen fanden sich interessanterweise auch IL-16 exprimierende Drüsenzellen in den Nasenschleimhäuten der Patienten mit allergischer Rhinitis. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das in den Nasenlavagen gefundene IL-16 zum Teil von den nasalen Drüsenzellen sezerniert wurde [198]. Auch Kramer et al. konnten in mittels Baumwollplättchen gewonnenen Nasensekreten einen Anstieg der IL-16-Konzentrationen fünf Stunden nach nasaler Allergenprovokation messen [196]. In den von Terada et al. gewonnenen Nasenlavagen konnten eine halbe Stunde und acht Stunden nach nasaler Allergenprovokation signifikant erhöhte IL-16-Konzentrationen gemessen werden [256]. 24 Stunden nach nasaler Allergenprovokation ließ sich außerdem eine signifikant erhöhte IL-16 mRNA Expression in Nasenschleimhautbiopsien von placebotherapierten Patienten im Vergleich mit glukokortikoidtherapierten Patienten nachweisen [257]. Demnach ist IL-16 neben IL-5 in der Spätphasereaktion der allergischen Rhinitis vermutlich ein wichtiger Faktor für den Einstrom der eosinophilen Granulozyten aber auch anderer Immunzellen in die Nasenschleimhaut.

## 4.4 Chemokine

Unter den CC-Chemokinen ergaben sich signifikant erhöhte Konzentrationen bei den Probanden mit allergischer Rhinitis für Eotaxin-3 ( $p=0,0008$ ), MCP-4 ( $p=0,0003$ ) und MIP-1 $\beta$  ( $p=0,0114$ ). Besonders interessant ist, dass die Unterschiede für die Chemokine Eotaxin-1 und MCP-1 nicht signifikant waren. Eotaxin und Monozyten-chemoattraktives Protein (MCP) weisen hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten auf, weshalb sie als eine Subgruppe der CC-Chemokine betrachtet werden können [258].

Sowohl Eotaxin-1 bis -3 als auch MCP-1 bis -4 können – wie einige weitere Chemokine – an den CC-Chemokinrezeptor CCR3 binden und so auf ihre CCR3-exprimierenden Zielzellen chemotaktisch wirken. Zu diesen Zellen gehören hauptsächlich eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen und Th2-Zellen. Es ergibt sich ein Spektrum aus besonders allergierelevanten Immunzellen, welches nahelegt, dass die CCR3-Liganden einen wichtigen Einflussfaktor für die Ausbildung allergischer Entzündungen und den damit einhergehenden zellulären Infiltraten darstellen [259]. So wurde zum Beispiel eine gesteigerte Expression von Eotaxin und CCR3 mRNA und Proteinen bereits in Bronchialschleimhäuten von Patienten mit allergischem Asthma und in Hautbiopsien von Patienten mit atopischer Dermatitis nachgewiesen [260,261]. Ein Einwirken von Eotaxin, MCP-3 und MCP-4 aus Homogenisaten nasaler Schleimhaut auf eosinophile Granulozyten konnte durch die Behandlung der eosinophilen Granulozyten mit CCR3-Antikörpern gehemmt werden [256]. In einer 2007 von Francis et al. veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass der Anteil der CCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen an den PBMCs von Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant höher lag als der von gesunden Kontrollprobanden [262].

Vor diesem Hintergrund erscheint besonders das unsignifikante Ergebnis von Eotaxin und MCP-1 zunächst überraschend. Als CCR3-Ligand spielt auch Eotaxin eine Rolle für allergische Erkrankungen. Terada et al. veröffentlichten 2001 Untersuchungen von Nasenlavagen nach nasaler Allergenprovokation. Sie stellten fest, dass Eotaxin sowie die Eosinophilen in den Nasenlavagen unmittelbar (30 min) nach der Provokation und erneut nach acht bis zehn Stunden signifikant höher konzentriert waren [256]. Pullerits et al. konnten immunhistochemisch während einer Pollensaison einen Anstieg der Eotaxin Expression in Nasenschleimhautbiopsien von placebotherapierten Patienten mit allergischer Rhinitis messen. Dieser blieb in den Nasenschleimhautbiopsien der beclomethasontherapierten Patienten aus [263].

Obwohl zwischen Eotaxin-1 und -3 große funktionelle Ähnlichkeiten bestehen, hängt ihre Expression von multiplen Faktoren ab und ihre Relation zueinander scheint im Verlauf variieren zu können. Eotaxine bewirken vorwiegend Chemotaxis, Aggregation, Aktivierung und Degranulation von eosinophilen Granulozyten sowie die Mobilisierung von eosinophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in das periphere Blut [264-272]. Trotzdem besitzen sie auch aktivierende Wirkung auf die anderen CCR3-exprimierenden Zellen [273].

Viele *in vitro* Studien haben das Verhaltensmuster von Lungen- und Hautzellen bezüglich der Eotaxin -1 bis -3 Expression untersucht. Lungenfibroblasten konnten durch IL-4 und besonders durch eine Kombination von IL-4 und TNF- $\alpha$  zur Produktion von Eotaxin-1 stimuliert werden. Bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  blieb eine derartige Wirkung jedoch aus. Untersuchungen von Hautfibroblasten- und Lungenepithelzellreihen zeigten, dass Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-13 sowie die Kombination von IL-4 mit TNF- $\alpha$  in der Lage waren, die Eotaxin-3-Produktion anzuregen. Im Gegensatz zu Eotaxin-1 konnte in den Zellüberständen unstimulierter Zellen kein Eotaxin-3 detektiert werden [274-276]. Während also Eotaxin-1 eher konstitutiv exprimiert wird, scheint Eotaxin-3 eher situativ ausgeschüttet zu werden.

Ying et al. berichteten, dass in ihren Untersuchungen von Bronchialbiopsien die *in vivo* Expression von Eotaxin-1 in dem Bronchialepithel von Asthmapatienten signifikant gegenüber der von Nichtasthmatikern erhöht war. Sie verwendeten *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie [260,277]. An allergenprovozierten Hautbiopsien, fand man heraus, dass Eotaxin-1 schon in der frühen Phase der allergischen Reaktion als mRNA und Protein zu finden ist. Eotaxin-2 mRNA ließ sich hingegen erst nach 24h feststellen [278]. Später untersuchten Berkman et al. die Eotaxin-1 bis -3 mRNA Expression in Bronchialbiopsien von Patienten mit Asthma und gesunden Kontrollprobanden mittels qPCR. Die Eotaxin-1 mRNA Expression war auch hier in den Bronchialbiopsien der Asthmapatienten signifikant höher als in den Kontrollbiopsien. Nach einer Allergenprovokation änderte sich dieses Verhältnis jedoch nicht. Allerdings erhöhte sich die Eotaxin-3 mRNA Expression in den Bronchialbiopsien der Asthmapatienten nach der Allergenprovokation signifikant [279]. Die Ergebnisse dieser Studien unterstützen die Eotaxin-3-Ergebnisse unserer Studie, da sie bekräftigen, dass besonders die Eotaxin-3-Konzentration nach Allergenkontakt auf den Oberflächen allergischer Epithelien ansteigt.

Greiff et al. zeigten 2001, dass die Eotaxin-1-Konzentrationen während einer Reihe von nasalen Allergenprovokationen in den Nasenlavagen ansteigen [280]. Die Eotaxin-1

Expression in Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition wurde in einer Veröffentlichung von Salib et al. aus dem Jahr 2005 untersucht. Sie konnten einen signifikanten Unterschied zwischen Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis und gesunden Kontrollprobanden feststellen. Die Nasenlavagen wurden mittels ELISA untersucht. Die Eotaxin-1-Konzentrationen der Probanden mit allergischer Rhinitis lagen zwar signifikant über denen der Kontrollen, jedoch waren sich die Dimensionen, in denen sich die Wertebereiche aller Gruppen bewegten, sehr ähnlich und lagen nur geringfügig unter denen, die wir messen konnten. Da diesbezüglich kein klarer Unterschied zwischen den gemessenen Eotaxin-1-Konzentrationen besteht und da der Median der Eotaxin-1-Konzentrationen unserer Studie in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis höher lag als der der Kontrollen, widersprechen unsere Eotaxin-1-Ergebnisse denen von Salib et al. nicht [281].

Laut Kitaura et al. 1999 ist die Bindung von Eotaxin-3 an CCR-3 zehnfach schwächer als die von Eotaxin an CCR3. Da die von uns gemessenen Eotaxin-3-Konzentrationen in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis, verglichen mit denen der Kontrollprobanden, zehnmal so hoch waren, widersprechen sich diese Ergebnisse nicht. Gleichzeitig lagen die Eotaxin-3-Konzentrationen der Probanden mit allergischer Rhinitis auch im Vergleich mit den Eotaxin-1-Konzentrationen aller Probanden zehnfach höher [264].

MCP-4 hat große strukturelle Ähnlichkeit zu MCP-1 bis -3 und Eotaxin sowie funktionelle Ähnlichkeit zu MCP-3 und Eotaxin [282]. Seine mRNA kann in einer Vielzahl menschlicher Gewebe gefunden werden, jedoch nicht in Leukozyten des peripheren Bluts. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten, T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten. Über den CCR3 Rezeptor können sowohl MCP-1 als auch MCP-4 eosinophile Granulozyten zur Degranulation stimulieren. Basophile Granulozyten können durch MCP-4 sogar zur Histaminfreisetzung angeregt werden. In allergisch und nicht-allergisch entzündeter Nasenschleimhaut wurden mittels *in situ* Hybridisierung signifikant höhere Anteile MCP-4 mRNA produzierender Gewebs- und Immunzellen beobachtet, als in der Nasenschleimhaut gesunder Probanden [272,283,284]. Die immunhistochemische Untersuchung von Schleimhautproben allergischer und nicht-allergischer chronischer Sinusitis ergab, dass zwar MCP-4 im Vergleich mit gesunder Nebenhöhlenschleimhaut in den allergischen und nicht-allergischen Schleimhäuten signifikant höher exprimiert war, jedoch nicht MCP-1 [285]. Auch Ying et al. konnten in ihren Untersuchungen signifikant mehr MCP-4 in den Bronchialbiopsien von allergischen und nichtallergischen Asthmatikern verglichen mit denen von allergischen und nichtallergischen Nichtasthmatikern feststellen

[277]. Ähnliche Erkenntnisse konnten Taha et al. an Hautbiopsien von Patienten mit atopischer Dermatitis gewinnen. Sie fanden signifikant mehr MCP-4 mRNA positive Zellen in akuten und chronischen Hautläsionen der atopischen Dermatitis als in nicht betroffener Haut und in Hautbiopsien von Kontrollprobanden [286]. MCP-4 scheint demnach sowohl eine Rolle in Th1- als auch in Th2-assoziierten Entzündungsreaktionen zu spielen. Eine Veröffentlichung von Miotto et al. aus dem Jahr 2001 kommt zu dem gleichen Ergebnis. Verglichen mit Kontrollprobanden waren MCP-1, MCP-3 und MCP-4 in BAL und Bronchialbiopsien von Patienten mit Th1- und Th2- assoziierten Lungenerkrankungen höher konzentriert. Die Proben wurden mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung untersucht [287]. Unsere MCP-4-Ergebnisse können diese vorangegangenen Untersuchungen bestätigen.

Gröger et al. untersuchten in ihrer 2012 veröffentlichten Studie auch die MCP-1-Konzentrationen in Nasensekreten von Patienten mit perennialer allergischer und nicht allergischer Rhinitis mit eosinophilem Syndrom. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen den MCP-1-Konzentrationen der Nasensekrete von Patienten mit allergischer Rhinitis und den Kontrollprobanden. Die MCP-1-Konzentrationen waren jedoch in den Nasensekreten der Patienten mit nichtallergischer Rhinitis signifikant gegenüber denen der Patienten mit allergischer Rhinitis und gegenüber denen der Kontrollprobanden erhöht [219]. Es zeigt sich, dass unsere Ergebnisse über MCP-1-Konzentrationen in Nasenlavagen von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis zu den ersten gehören und den bisher vorliegenden Ergebnissen nicht widersprechen.

Das *macrophage inflammatory protein -1 $\beta$*  (MIP-1 $\beta$ ) bindet hauptsächlich an den CCR5 Rezeptor, welcher vor allem auf Th1-Zellen exprimiert wird [288]. Außerdem ist MIP-1 $\beta$  in der Lage CCR8 zu binden [289,290]. Es wird mit Th1-Immunantworten assoziiert, da es von Th1-Zellen synthetisiert wird, jedoch nicht von Th2-Zellen [291]. Eine weitere Funktion des MIP-1 $\beta$  neben der T-Zell- Chemotaxis scheint die Verstärkung der Adhäsion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen an *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) zu sein [292]. In der 2010 von Chawes et al. veröffentlichten Studie über die Zytokin- und Chemokin-konzentrationen in Nasensekreten von Probanden mit allergischer Rhinitis und Kontrollprobanden, ergab sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Nasensekreten der Probanden mit allergischer Rhinitis [218]. Auch Gröger et al. stellten fest, dass sowohl die MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Nasensekreten der Patienten mit persistierender allergischer Rhinitis, als auch die der Patienten mit nichtallergischer

Rhinitis mit eosinophilem Syndrom signifikant höher waren als die der Kontrollgruppe [219]. In der Zusammenschau mit der ebenfalls signifikanten Erhöhung der MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Nasenlavagen der Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis unserer Studie, ergeben sich aufgrund der Th1-Assoziation von MIP-1 $\beta$  Widersprüche. Berücksichtigt man, dass auch Monozyten, NK-Zellen, antigenstimulierte B-Zellen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von MIP-1 $\beta$  fähig sind [293-297] und dass der CCR5 Rezeptor außer auf Th2-Zellen und Granulozyten auf nahezu allen Immunzellen exprimiert wird, so ist es aber nicht abwegig, höhere MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen sowohl auf allergisch entzündeter als auch auf gesunder Nasenschleimhaut vorzufinden. Es wären zusätzliche Untersuchungen gesunder und aus unterschiedlicher Ursache entzündeter Nasenschleimhaut notwendig, um die bisherigen MIP-1 $\beta$ -Ergebnisse besser einordnen zu können.

Die Konzentrationsunterschiede der Chemokine IP-10, MDC und TARC zwischen den Nasenlavagen der Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis und den Kontrollprobanden waren nicht signifikant. Das *macrophage-derived chemokine* (MDC) wird konstitutiv von dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen produziert und wirkt interessanterweise besonders chemotaktisch auf chronisch aktivierte Th2-Zellen. Die MDC Freisetzung kann durch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 positiv beeinflusst, jedoch von IL-10 gehemmt werden [290]. *Thymus and activation-regulated chemokine* (TARC) wird von Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen besonders unter Einwirken von Th2-Zytokinen exprimiert und wirkt chemotaktisch auf Effektor- und Memory-T-Zellen [298,299]. Auch die Produktion und Freisetzung von TARC kann durch Th2-Zytokine gesteigert werden [300,301]. MDC und TARC ähneln sich stark in ihrem Wirkspektrum, da sie beide den CCR4 Rezeptor binden und aktivieren [298,302,303]. Panina-Bordignon et al. veröffentlichten 2001 eine Studie über die CCR4 sowie TARC und MDC Expression in Bronchialbiopsien von sechs Patienten mit atopischem Asthma 24 Stunden nach Allergenchallenge verglichen mit sechs Patienten mit atopischem Asthma ohne Allergenchallenge und drei gesunden Kontrollprobanden. Sie verwendeten mittels Immunfluoreszenz gefärbte Gewebeschnitte für diesem Vergleich und fanden deutlich hochregulierte CCR4 Expression auf den T-Zellen der provozierten Bronchialschleimhaut. MDC und TARC wurden ebenfalls signifikant stärker durch die provozierten Bronchialschleimhautzellen exprimiert [304]. Obwohl unsere MDC- und TARC-Ergebnisse nicht signifikant sind, las-

sen sich die erkennbaren Tendenzen in der Konzentrationsverteilung dieser beiden Chemokine durchaus nachvollziehen.

Humanes *interferon-inducible protein 10* (IP-10) ist als CXC-Chemokin bekannt, welches Th1-Antworten verstärkt. Im Gegensatz zu CC-Chemokinen bewirken CXC-Chemokine nur eine Chemotaxis und keine transendotheliale Migration der Immunzellen[305]. Der IP-10-Rezeptor CXCR3 wird von Th1-Zellen exprimiert und IP-10 förderte selektiv die antigen-vermittelte IFN- $\gamma$ -Antwort, nicht aber die IL-4-Antwort, von antigen-stimulierten PBMCs [306]. Miotto et al. untersuchten auch IP-10 und Eotaxin. IP-10 wurde besonders in BAL und Bronchialbiopsien von Patienten mit der Th1-assoziierten Lungenerkrankung Sarkoidose verstärkt exprimiert. Eher gegenteiliges galt für Eotaxin. Dieses konnte lediglich in BAL und Bronchialbiopsien von Asthmapatienten und demnach einer Th2-assoziierten Erkrankung in signifikant erhöhtem Maß gefunden werden [287]. Dementsprechend überraschen unsere IP-10-Ergebnisse nicht, da die IP-10 Expression von Th2-Antworten unbeeinflusst zu sein scheint.

Das CXC-Chemokin IL-8 war bei den Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht ( $p=0,0199$ ). IL-8 wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten sowie Epithel- und Endothelzellen freigesetzt [307-312]. Seine Hauptwirkung ist die Chemotaxis und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Von allen CXC-Chemokinen scheint IL-8 jedoch auch das zu sein, welches am stärksten auf andere Zellen, wie basophile Granulozyten und T-Lymphozyten, chemotaktisch wirken kann [307,313].

IL-8 war signifikant höher in den BAL von Asthmapatienten, verglichen mit den BAL von gesunden Kontrollprobanden, konzentriert. Diese Studie erschien 1995 von Yousefi et al. [311]. Hoshi et al. verglichen Sputumproben von Patienten mit Asthma bronchiale und chronischer Bronchitis mittels Cytospin. Die IL-8-Sputumkonzentrationen der Patienten mit chronischer Bronchitis waren signifikant höher als die der Asthmapatienten. Dabei handelte es sich um IL-8 positive neutrophile Granulozyten in den Proben der Patienten mit chronischer Bronchitis und um IL-8 positive Monozyten, Makrophagen und Bronchialepithelzellen im Sputum von Patienten mit Asthma bronchiale [314]. Ähnliche Ergebnisse konnten von Yamamoto et al. ermittelt werden. Die IL-8-Sputumkonzentrationen von gesunden Kontrollprobanden lagen signifikant unter denen von Asthmapatienten. Die IL-8-Sputumkonzentrationen der Patienten mit Asthma bronchi-

ale lagen wiederum signifikant unter denen der Patienten mit COPD [315]. Bradding et al. fanden 1993 immunhistochemisch sowohl in gesunden Nasenschleimhautbiopsien, als auch in Biopsien von Patienten mit perennialer allergischer Rhinitis IL-8. Dieses fand sich vorrangig in den Epithelzellen der Nasenschleimhaut und nur in den rhinitischen Biopsien auch in wenigen submukösen granulierten Zellen. Es wurde mittels weiterer Färbungen ermittelt, dass es sich dabei nicht um T-Zellen, eosinophile Granulozyten und Mastzellen handelte [223]. In der Studie von Ciprandi et al. bestätigte sich eine signifikante Erhöhung von IL-8 in den Nasenlavagen der Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis [316]. Erin et al. untersuchten in einer Provokationsstudie die Zytokinkonzentrationen in Nasenlavagen einer Gruppe von Patienten nach Placebogabe und einer Gruppe von Patienten nach einmaliger nasaler Budesonidgabe. Sie fanden heraus, dass diese einmalige Gabe von Glukokortikoiden auf die IL-8-Lavagekonzentrationen der Patienten mit allergischer Rhinitis keinen Einfluss hatte. Im Gegensatz dazu wurden die IL-5- und IL-13-Konzentrationsanstiege durch das Glukokortikoid signifikant vermindert [243]. Allerdings waren nach einer vorhergehenden siebentägigen nasalen Glukokortikoidtherapie sowohl die Th2-Zytokin- als auch die Chemokinkonzentrationen in den Nasenlavagen der Spätphasereaktion signifikant verringert. Gleichzeitig gemessene Th1-Zytokinkonzentrationen zeigten sich unverändert [215]. Diese Studien weisen darauf hin, dass IL-8 zwar keine Hauptfunktion für die Ausbildung einer allergischen Entzündungsreaktion innehat, jedoch, aufgrund der im Vergleich zur gesunden Schleimhaut erhöhten IL-8-Konzentrationen, auf allergisch erkrankten Schleimhautoberflächen, trotzdem eine Rolle spielt.

Zwischen den hier beschriebenen Chemokinen bestehen verschiedenste Korrelationen, wie im Ergebnisteil beschrieben. Kritisch betrachtet ist es jedoch unwahrscheinlich, dass einzelne Chemokine für sich im Zusammenhang mit allergischer Rhinitis relevant sind. Diese Botenstoffe bilden vielmehr ein sehr komplexes und umfangreiches Mediatorsystem. Gerade deren vielfältige Korrelationen untereinander und mit den Zytokinen IL-5 und IL-16 sowie mit sST2 unterstreichen die Unterschiede der hier ermittelten Zytokin- und Chemokinprofile in Nasenlavagen von Probanden mit allergischer Rhinitis und gesunden Kontrollprobanden während natürlicher Allergenexposition. Dennoch sollten einzelne Korrelationen nicht überbewertet werden, da sich unter ihnen wohl kaum ein geeignetes Target im Einsatz gegen die allergische Rhinitis findet.

## 4.5 Methodik

Unter den Bedingungen der natürlichen Exposition wird die Krankheit und ihre Pathophysiologie direkt untersucht, während die Provokation letztendlich auch nur ein experimentelles Modell ist.

Es gibt keine internationalen Richtlinien zur Durchführung nasaler Allergenprovokationen. Einen wesentlichen Unterschied zwischen nasalen Provokationsstudien und Studien nach natürlicher Allergenexposition stellen die verschiedenen Allergenkonzentrationen dar, denen die Nasenschleimhaut ausgesetzt wird. Die Allergenkonzentrationen in den Extrakten, welche für die nasale Provokation genutzt werden, sind im Allgemeinen um ein Vielfaches höher, als die natürliche Allergendosis in der Allergiesaison. So wird in einer nasalen Provokation eine Menge an Allergen appliziert, die zusammengerechnet in der Allergiesaison über mehrere Tage bis Wochen auf die Nasenschleimhaut einwirken kann [317].

Es ergibt sich indirekt ein weiterer Effekt, der von nasalen Provokationsstudien nur schwer berücksichtigt werden kann: das *Priming*. Dies bedeutet, dass die Symptome der allergischen Rhinitis am Ende der Allergiesaison stärker ausgeprägt sind, als zu Beginn [318,319]. Nur durch die wiederholte nasale Provokation über mehrere Tage bis Wochen, kann dieser Effekt nachgeahmt werden, um so möglichst naturgetreu die Mechanismen der allergischen Rhinitis zu untersuchen [320]. Wang et al. fanden heraus, dass die Konzentrationen ausgewählter Botenstoffe in Nasensekreten während der Allergiesaison eher denen der allergischen Spätphase nach nasaler Provokation entsprechen [321]. Klimek et al. konnten außerdem herausstellen, dass nasale Symptome in der nasalen Provokation innerhalb der Allergiesaison durch signifikant geringere Allergendosen hervorgerufen werden als außerhalb der Allergiesaison [322]. In vielen Provokationsstudien ist man zu einer wiederholten nasalen Provokation übergegangen. Dabei ist immer zu berücksichtigen, ob die Studie innerhalb oder außerhalb der Allergiesaison stattgefunden hat. Die Ergebnisse können zwar als Modell der allergischen Rhinitis betrachtet werden, ergänzende Informationen aus Studien nach natürlicher Allergenexposition sind jedoch unabdingbar.

Neben der Art der Allergenexposition, gibt es auch verschiedene Möglichkeiten der Sekretgewinnung. Im Wesentlichen stehen unterschiedliche nasale Absorptionsmethoden der Nasenlavage gegenüber. So können kleine Scheiben aus Filterpapier genutzt werden, um einerseits Substanzen auf die Nasenschleimhaut zu bringen und andererseits Nasensekret unmittelbar aufzunehmen. Nachdem zuvor gewogene Filterpapierscheiben für etwa

30-45 Sekunden auf der Nasenschleimhaut belassen wurden, kann die Masse des gewonnenen Sekrets ausgewogen werden. Die so gewonnenen Sekrete werden mit dem Filterpapier in vordefinierten Volumina verdünnt [323]. So ist eine genaue Quantifizierung des Sekrets möglich. Das ist neben der guten Reproduzierbarkeit einer der größten Vorteile an der Absorptionsmethode mit Filterpapier. Jedoch lässt sich hier auch der größte Nachteil erkennen: das sehr geringe auswertbare Sekretvolumen. Dadurch ist die Anzahl durchführbarer Messungen aus einer Probe stark begrenzt.

Zu den Absorptionsmethoden gehören neben den Filterpapieren auch das Einlegen von Baumwollstreifen oder anderen synthetischen Materialien, wie Schaumstoffen. Die Messungen aus Sekreten, die mittels dieser Methode gewonnen wurden, befinden sich scheinbar aufgrund der geringeren Verdünnung seltener unterhalb der Nachweisgrenze als die aus Nasenlavagen [324,325]. Es lässt sich jedoch nicht ausmachen, ob die Botenstoffkonzentrationen aufgrund der mechanischen Stimulation, der die Nasenschleimhaut durch das jeweilige Material ausgesetzt ist, artifiziell verändert werden.

Nasenlavagen sind im Vergleich sehr einfach durchzuführen. Sowohl die bronchoalveoläre als auch nasale Lavage sind seit über zwei Jahrzehnten als ein wichtiger Pfeiler der Forschung im Bereich der Atemwege etabliert [326,327]. Die Sekretmengen sind jedoch nicht genau zu quantifizieren. Der große Vorteil der Nasenlavage ist das große Sekretvolumen, welches umfangreichere Messungen aus einer Probe erlaubt. Allerdings sind entsprechend empfindliche Messmethoden erforderlich, da die gewonnenen Sekrete stark verdünnt sind [328,329].

## **4.6 Abschlussbemerkungen**

In dieser Studie wurden IL-33 und sST2 sowie Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den Nasenlavagen von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis mit denen von gesunden Kontrollprobanden verglichen. Die Messwerte der IL-33-Konzentrationen befanden sich komplett unterhalb der Nachweisgrenze. Die Messungen seines löslichen Rezeptors sST2 ergaben eine signifikante Erhöhung in den Nasenlavagen der Probanden mit allergischer Rhinitis. Damit ist sie die erste Studie, die diese erhöhten Konzentrationen von sST2 auf der Nasenschleimhaut nach natürlicher Allergenexposition feststellt. Dieses Ergebnis stützt die Theorie, dass sST2 im Rahmen der allergischen Entzündungsreaktion vermehrt freigesetzt wird, um IL-33 zu binden und so zu blockieren. Des Weiteren korrelierten die sST2-Konzentrationen der Probanden mit allergischer Rhinitis negativ mit den nasalen Beschwerden.

Ein großer Vorteil der Studie ist, dass die Nasenlavagen nach natürlicher Allergenexposition gewonnen wurden. Allerdings müssten weitere Untersuchungen unter gleichen Expositionsbedingungen folgen, in denen die Bestimmung der IL-33-Konzentrationen in Nasensekreten mit empfindlicheren Messmethoden durchgeführt wird. Durch die simultane Erhebung der IL-33- und sST2-Konzentrationen in Zusammenschau mit den Konzentrationen weiterer allergietypischer Botenstoffe und der klinischen Symptome kann dabei die hier angedeutete Theorie weiter ausgebaut werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] M. Sakashita, T. Yoshimoto, T. Hirota, M. Harada, K. Okubo, Y. Osawa, et al., Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis, *Clinical & Experimental Allergy*. 38 (2008) 1875–1881. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03114.x.
- [2] J. Glück, B. Rymarczyk, B. Rogala, Serum IL-33 but not ST2 level is elevated in intermittent allergic rhinitis and is a marker of the disease severity, *Inflamm Res*. (2012). doi:10.1007/s00011-012-0443-9.
- [3] R. Kamekura, T. Kojima, K. Takano, M. Go, N. Sawada, T. Himi, The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis, *Clin Exp Allergy*. 42 (2012) 218–228. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x.
- [4] V. Bauchau, Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe, *European Respiratory Journal*. (2004).
- [5] D. Strachan, B. Sibbald, S. Weiland, Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Strachan - 2007 - *Pediatric Allergy and Immunology - Wiley Online Library*, *Pediatric Allergy ...* (1997).
- [6] Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee, *Lancet*. 351 (1998) 1225–1232.
- [7] N.C.F.H. Statistics, Vital and Health Statistics Series 10 No. 247, December 2010, (2011) 1–91.
- [8] N.C.F.H. Statistics, Vital and Health Statistics, Series 10, Number 249 (12/2010), (2011) 1–217.
- [9] J. Bousquet, P. Van Cauwenberge, Allergic rhinitis and its impact on asthma, *Journal of Allergy*. (2001).
- [10] N. Åberg, Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts - ÅBERG - 2006 - *Clinical & Experimental Allergy - Wiley Online Library*, *Clinical & Experimental Allergy*. (1989).
- [11] R. Sly, ScienceDirect - *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* : Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma, *Ann Allergy*. (1999).
- [12] Y. Sakurai, K. Nakamura, K. Teruya, N. Shimada, ScienceDirect - *Preventive Medicine* : Prevalence and Risk Factors of Allergic Rhinitis and Cedar Pollinosis among Japanese Men, *Preventive ...* (1998).
- [13] E. von Mutius, S.K. Weiland, C. Fritsch, H. Duhme, U. Keil, Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany, *Lancet*. 351 (1998) 862–866. doi:10.1016/S0140-6736(97)10100-3.
- [14] J. Heinrich, B. Hoelscher, C. Frye, Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany, *European ...* (2002).
- [15] W. Maziak, T. Behrens, T. Brasky, H. Duhme, Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany - Maziak - 2003 - *Allergy - Wiley Online Library*, *Allergy*. (2003).
- [16] D. Nowak, J. Heinrich, R. Jörres, G. Wassmer, J. Berger, E. Beck, et al., Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany, *Eur. Respir. J.* 9 (1996) 2541–2552.
- [17] T. Nicolai, B. Bellach, E.V. Mutius, W. Thefeld, H. Hoffmeister, Increased

- prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany, *Clin Exp Allergy*. 27 (1997) 886–892.
- [18] A. Rhinitis, its Impact on Asthma (ARIA) At-A-Glance Pocket Reference.–2007, (n.d.).
- [19] C. Neukirch, R. Liard, J. Bousquet, Quality of Life in Allergic Rhinitis and Asthma, *American Journal of ....* (2000).
- [20] W.A. Greisner, R.J. Settipane, G.A. Settipane, Co-existence of asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students, *Allergy Asthma Proc*. 19 (1998) 185–188.
- [21] B. Sibbald, E. Rink, Epidemiology of seasonal and perennial rhinitis: clinical presentation and medical history, *Thorax*. 46 (1991) 895–901.
- [22] C. Fourre-Jullian, H. Jullian, M. Badier, Rhinitis alone or rhinitis plus asthma: what makes the difference? *European ....* (1998).
- [23] M. Shibasaki, T. Hori, T. Shimizu, S. Isoyama, K. Takeda, H. Takita, Relationship between asthma and seasonal allergic rhinitis in schoolchildren, *Ann Allergy*. 65 (1990) 489–495.
- [24] G. Herbison, M. Holdaway, The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma - SEARS - 2006 - *Clinical & Experimental Allergy - Wiley Online Library, Clinical & ....* (1989).
- [25] P.W. Welsh, W.E. Stricker, C.P. Chu, J.M. Naessens, M.E. Reese, C.E. Reed, et al., Efficacy of beclomethasone nasal solution, flunisolide, and cromolyn in relieving symptoms of ragweed allergy, *Mayo Clin. Proc*. 62 (1987) 125–134.
- [26] J. Corren, A.D. Adinoff, A.D. Buchmeier, C.G. Irvin, Nasal beclomethasone prevents the seasonal increase in bronchial responsiveness in patients with allergic rhinitis and asthma, *J. Allergy Clin. Immunol*. 90 (1992) 250–256.
- [27] W.T.A. Watson, A.B. Becker, F. Simons, Treatment of allergic rhinitis with intranasal corticosteroids in patients with mild asthma: effect on lower airway responsiveness, *J. Allergy Clin. Immunol*. 91 (1993) 97–101.
- [28] A. Foresi, A. Pelucchi, G. Gherson, Once daily intranasal fluticasone propionate (200 µg) reduces nasal symptoms and inflammation but also attenuates the increase in bronchial responsiveness during the pollen season in allergic rhinitis 10.1016/S0091-6749(96)70150-1 : *Journal of Allergy and Clinical Immunology | ScienceDirect.com, Journal of Allergy and ....* (1996).
- [29] J. Crystal-Peters, C. Neslusan, W. Crown, Treating allergic rhinitis in patients with comorbid asthma: The risk of asthma-related hospitalizations and emergency department visits 10.1067/mai.2002.120554 : *Journal of Allergy and Clinical Immunology | ScienceDirect.com, Journal of Allergy and ....* (2002).
- [30] S. Berrettini, A. Carabelli, S. Sellari-Franceschini, L. Bruschini, F. Quartieri, F. Sconosciuto, et al., Perennial allergic rhinitis and chronic sinusitis: correlation with rhinologic risk factors, *Allergy*. 54 (1999) 242–248. doi:10.1034/j.1398-9995.1999.00813.x.
- [31] H. Nolte, S. Nepper-Christensen, V. Backer, Unawareness and undertreatment of asthma and allergic rhinitis in a general population, *Respiratory Medicine*. 100 (2006) 354–362. doi:10.1016/j.rmed.2005.05.012.
- [32] J. Bousquet, Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) - Bousquet - 2003 - *Clinical & Experimental Allergy Reviews - Wiley Online Library, Clinical & Experimental Allergy Reviews*. (2003).
- [33] S. Bisdas, M. Bloching, H. Claassen, M. Fischer, J. Gille, J. Heckmann, et al., Nase, Nasennebenhöhlen (NNH), Gesicht und vordere Schädelbasis, *Facharz-*

- twissen HNO-Heilkunde. (2009) 319–432.
- [34] H. Riechelmann, C. Bachert, O. Goldschmidt, B. Hauswald, L. Klimek, W.W. Schlechter, et al., Durchführung des nasalen Provokationstests bei Erkrankungen der oberen Atemwege, *Allergo J.* 11 (2002) 29–36.
- [35] H. Ott, J. Baron, H.F. Merk, In-vitro-Testungen in der Allergologie, *Hautarzt.* 57 (2006) 502–508. doi:10.1007/s00105-006-1167-y.
- [36] Wetter und Klima - Deutscher Wetterdienst -- Biowetter, Dwd.De. (n.d.).
- [37] J. Bousquet, R. Lockey, Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper 10.1016/S0091-6749(98)70271-4 : *Journal of Allergy and Clinical Immunology* | ScienceDirect.com, ... *Of Allergy and Clinical Immunology.* (1998).
- [38] R.N. Ross, H.S. Nelson, I. Finegold, Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies, *Clinical Therapeutics.* 22 (2000) 342–350.
- [39] M.A. Calderon, B. Alves, M. Jacobson, B. Hurwitz, A. Sheikh, S. Durham, Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis, *Cochrane Database Syst Rev.* (2007) CD001936. doi:10.1002/14651858.CD001936.pub2.
- [40] J. Kleine-Tebbe, A. Bufe, C. Ebner, P. Eigenmann, F. Friedrichs, T. Fuchs, et al., Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen, *Allergo J.* 18 (2009) 508–537.
- [41] M.A. Calderon, F.E.R. Simons, H.J. Malling, R.F. Lockey, P. Moingeon, P. Demoly, Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile, *Allergy.* (2011). doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02761.x.
- [42] M.S. Blaiss, Allergic rhinitis: Direct and indirect costs, *Allergy Asthma Proc.* 31 (2010) 375–380. doi:10.2500/aap.2010.31.3329.
- [43] A. Soni, Soni: Allergic rhinitis: trends in use and expenditures,... - Google Scholar, (2008).
- [44] M.T. Halpern, J.K. Schmier, R. Richner, C. Guo, A. Togias, Allergic Rhinitis: A Potential Cause of Increased Asthma Medication Use, Costs, and Morbidity, *J Asthma.* 41 (2004) 117–126. doi:10.1081/JAS-120026069.
- [45] W.F. Schoenwetter, L. Dupclay, S. Appajosyula, M.F. Botteman, C.L. Pashos, Economic impact and quality-of-life burden of allergic rhinitis, *Curr Med Res Opin.* 20 (2004) 305–317. doi:10.1185/030079903125003053.
- [46] P. Van Cauwenberge, H. Van Hoecke, P. Kardos, D. Price, S. Wasserman, The current burden of allergic rhinitis amongst primary care practitioners and its impact on patient management, *Prim Care Respir J.* 18 (2009) 27–33. doi:10.3132/pcrj.2008.00042.
- [47] C.E. Lamb, P.H. Ratner, C.E. Johnson, A.J. Ambegaonkar, A.V. Joshi, D. Day, et al., Economic impact of workplace productivity losses due to allergic rhinitis compared with select medical conditions in the United States from an employer perspective, *Www.Informapharmascience.com/Cmo.* (2006).
- [48] P.A. Stumbles, Regulation of T helper cell differentiation by respiratory tract dendritic cells, *Immunol. Cell Biol.* 77 (1999) 428–433. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00850.x.
- [49] B. Lebel, J. Bousquet, A. Morel, I. Chanal, P. Godard, F.B. Michel, Correlation between symptoms and the threshold for release of mediators in nasal secretions during nasal challenge with grass-pollen grains, *J. Allergy Clin. Immunol.* 82 (1988) 869–877.
- [50] W.J. Doyle, S. Boehm, D.P. Skoner, Physiologic responses to intranasal dose-

- response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 86 (1990) 924–935.
- [51] S. Durham, S. Ying, V. Varney, Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia, *The Journal of ...* (1992).
- [52] V.A. Varney, M.R. Jacobson, R.M. Sudderick, D.S. Robinson, A.-M.A. Irani, L.B. Schwartz, et al., Immunohistology of the Nasal Mucosa Following Allergen-induced Rhinitis: Identification of Activated T Lymphocytes, Eosinophils, and Neutrophils, (1992).
- [53] C.-M. Kang, A.-S. Jang, M.-H. Ahn, J.-A. Shin, J.-H. Kim, Y.-S. Choi, et al., Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 33 (2005) 290–296. doi:10.1165/rcmb.2005-0003OC.
- [54] S.R. Dillon, C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 752–760. doi:10.1038/ni1084.
- [55] J. Bilsborough, D.Y.M. Leung, M. Maurer, M. Howell, M. Boguniewicz, M. Boguniewicz, et al., IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 (2006) 418–425. doi:10.1016/j.jaci.2005.10.046.
- [56] T. Mosmann, R. Coffman, *Advances in Immunology - Frank J. Dixon* - Google Books, *Adv Immunol.* (1989).
- [57] L. Steinman, A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage, *Nat. Med.* 13 (2007) 139–145. doi:10.1038/nm1551.
- [58] K. Oboki, T. Ohno, H. Saito, S. Nakae, Th17 and Allergy, *Allergol. Int.* 57 (2008) 121–134. doi:10.2332/allergolint.R-07-160.
- [59] M.A.M. PhD, S.B. PhD, R.C. PhD, T.E. MD, H.F.M. PhD, E.G. PhD, et al., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 701–721.e70. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- [60] C. Infante-Duarte, H.F. Horton, M.C. Byrne, T. Kamradt, Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells, *J. Immunol.* 165 (2000) 6107–6115.
- [61] X.Y. Cai, C.P. Gommoll, L. Justice, S.K. Narula, J.S. Fine, Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17, *Immunol. Lett.* 62 (1998) 51–58.
- [62] S.B. Forlow, J.R. Schurr, J.K. Kolls, G.J. Bagby, P.O. Schwarzenberger, K. Ley, Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice, (2001).
- [63] S. Sergejeva, S. Ivanov, J. Lötvall, A. Lindén, Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 33 (2005) 248–253. doi:10.1165/rcmb.2004-0213OC.
- [64] M. Laan, Z.-H. Cui, H. Hoshino, J. Lötvall, M. Sjöstrand, D.C. Gruenert, et al., Neutrophil Recruitment by Human IL-17 Via C-X-C Chemokine Release in the Airways, (1999).
- [65] S. Molet, Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Pagé, et al., IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce

- cytokines☆, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108 (2001) 430–438. doi:10.1067/mai.2001.117929.
- [66] G. Ciprandi, D. Fenoglio, M. De Amici, S. Quaglini, S. Negrini, G. Filaci, Serum IL-17 levels in patients with allergic rhinitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (2008) 650–1.e2. doi:10.1016/j.jaci.2008.06.005.
- [67] G. CIPRANDI, M. De Amici, G. Murdaca, D. FENOGLIO, F. Ricciardolo, G. Marseglia, et al., Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis, *Allergy*. 64 (2009) 1375–1378. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02010.x.
- [68] G. Ciprandi, G. Filaci, D. Fenoglio, Th17 cells and allergic rhinitis: Is there clinical relevance? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 143 (2010) 604–605. doi:10.1016/j.otohns.2010.07.005.
- [69] G. Ciprandi, G. Filaci, F. Battaglia, D. Fenoglio, Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: New evidence, *Int. Immunopharmacol.* 10 (2010) 226–229. doi:10.1016/j.intimp.2009.11.004.
- [70] G. CIPRANDI, A.M. Castellazzi, D. FENOGLIO, F. Battaglia, G. Marseglia, Peripheral TH-17 cells in children with allergic rhinitis: preliminary report, *Int J Immunopathol Pharmacol.* 23 (2010) 379–382.
- [71] C. Klemens, G. Rasp, F. Jund, E. Hilgert, C. Devens, E. Pfrogner, et al., Mediators and cytokines in allergic and viral-triggered rhinitis, *Aap*. 28 (2007) 434–441. doi:10.2500/aap.2007.28.3017.
- [72] J.-T. Du, L. Ba, T.-T. Shang, Y.-F. Liu, D.-P. Wei, H.-M. An, [The expression of interleukin-17 in blood and nasal tissue of patients with allergic rhinitis and nasal polyps], *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 41 (2010) 235–238.
- [73] D. Han, C. Wang, W. Lou, Y. Gu, Y. Wang, L. Zhang, Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis, *Clin. Immunol.* 136 (2010) 292–301. doi:10.1016/j.clim.2010.03.006.
- [74] J.A. Bluestone, A.K. Abbas, Opinion-Regulatory Lymphocytes: Natural versus adaptive regulatory T cells, *Nat Rev Immunol.* 3 (2003) 253–257. doi:10.1038/nri1032.
- [75] G. Gri, S. Piconese, B. Frossi, V. Manfredi, S. Merluzzi, C. Tripodo, et al., CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction, *Immunity*. 29 (2008) 771–781. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.018.
- [76] L. Cederbom, H. Hall, F. Ivars, CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 1538–1543. doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1538::AID-IMMU1538>3.0.CO;2-X.
- [77] N. Misra, J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M.D. Kazatchkine, S.V. Kaveri, Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells, (2004).
- [78] P. Lewkowicz, N. Lewkowicz, A. Sasiak, H. Tchórzewski, Lipopolysaccharide-Activated CD4+CD25+ T Regulatory Cells Inhibit Neutrophil Function and Promote Their Apoptosis and Death, (2006).
- [79] I. Barao, A.M. Hanash, W. Hallett, L.A. Welniak, K. Sun, D. Redelman, et al., Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4+CD25+ regulatory T cells, (2006).
- [80] M.K. Levings, Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells, *Blood*. 105 (2004) 1162–1169.

- doi:10.1182/blood-2004-03-1211.
- [81] D.F. Fiorentino, A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, A. O'Garra, IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, (1991).
- [82] C. Bogdan, Macrophage deactivation by interleukin 10, *Journal of Experimental Medicine*. 174 (1991) 1549–1555. doi:10.1084/jem.174.6.1549.
- [83] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, *The Journal of ...* (1991).
- [84] R. de Waal Malefyt, Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 915–924. doi:10.1084/jem.174.4.915.
- [85] R. de Waal Malefyt, H. Yssel, Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation, *The Journal of ...* (1993).
- [86] M.-T. Bejarano, R. de W. Malefyt, J.S. Abrams, M. Bigler, R. Bacchetta, J.E. de Vries, et al., Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures, *Int. Immunol.* 4 (1992) 1389–1397. doi:10.1093/intimm/4.12.1389.
- [87] K. Taga, H. Mostowski, G. Tosato, Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth, *Blood*. 81 (1993) 2964–2971.
- [88] L. Schandené, C. Alonso-Vega, F. Willems, C. Gérard, A. Delvaux, T. Velu, et al., B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10, *J. Immunol.* 152 (1994) 4368–4374.
- [89] M. Akdis, Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells, *Journal of Experimental Medicine*. 199 (2004) 1567–1575. doi:10.1084/jem.20032058.
- [90] E.M. Ling, T. Smith, X.D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, et al., Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease, *Lancet*. 363 (2004) 608–615. doi:10.1016/S0140-6736(04)15592-X.
- [91] A.E. Anderson, K.J. Mackerness, M. Aizen, V.A. Carr, D. Nguyen, F.D. Pre, et al., Seasonal changes in suppressive capacity of CD4 +CD25 +T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25 +population, *Clinical & Experimental Allergy*. 39 (2009) 1693–1699. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03320.x.
- [92] J. Kearley, J.E. Barker, D.S. Robinson, C.M. Lloyd, Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1539–1547. doi:10.1084/jem.20051166.
- [93] J. Kearley, D.S. Robinson, C.M. Lloyd, CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling, *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (2008) 617–24.e6. doi:10.1016/j.jaci.2008.05.048.
- [94] F. Meiler, S. Klunker, M. Zimmermann, C.A. Akdis, M. Akdis, Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors, *Allergy*. 63 (2008) 1455–1463. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x.
- [95] J.N. Francis, S.J. Till, S.R. Durham, Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) 1255–1261.

- [96] S. Radulovic, M. Jacobson, S. Durham, ScienceDirect.com - Journal of Allergy and Clinical Immunology - Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa, Journal of Allergy and .... (2008).
- [97] C. Dinarello, ScienceDirect - Journal of Allergy and Clinical Immunology : IL-18: A TH1 -inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family, Journal of Allergy and Clinical Immunology. (1999).
- [98] F.L. van de Veerdonk, M.G. Netea, C.A. Dinarello, L.A.B. Joosten, Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection, Trends Immunol. 32 (2011) 110–116. doi:10.1016/j.it.2011.01.003.
- [99] J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, et al., IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, Immunity. 23 (2005) 479–490. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015.
- [100] C.A. Dinarello, An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor, Immunity. 23 (2005) 461–462. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.004.
- [101] G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, SpringerLink - Journal of Clinical Immunology, Volume 19, Number 1, Journal of Clinical Immunology. 19 (1999) 1–11. doi:10.1023/A:1020506300324.
- [102] A.U. Lüthi, S.P. Cullen, E.A. McNeela, P.J. Duriez, I.S. Afonina, C. Sheridan, et al., Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases, Immunity. 31 (2009) 84–98. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.007.
- [103] C. Cayrol, J.-P. Girard, The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. 106 (2009) 9021–9026. doi:10.1073/pnas.0812690106.
- [104] S. Ali, D. Nguyen, W. Falk, ScienceDirect - Biochemical and Biophysical Research Communications : Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation, Biochemical and Biophysical .... (2010).
- [105] T. Ohno, K. Oboki, N. Kajiwara, E. Morii, K. Aozasa, R.A. Flavell, et al., Caspase-1, Caspase-8, and Calpain Are Dispensable for IL-33 Release by Macrophages, The Journal of Immunology. 183 (2009) 7890–7897. doi:10.4049/jimmunol.0802449.
- [106] D. Talabot-Ayer, C. Lamacchia, C. Gabay, G. Palmer, Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage, J. Biol. Chem. 284 (2009) 19420–19426. doi:10.1074/jbc.M901744200.
- [107] E. Lefrançois, S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J.-P. Girard, et al., IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. 109 (2012) 1673–1678. doi:10.1073/pnas.1115884109.
- [108] V. Carriere, L. Roussel, N. Ortega, D.-A. Lacorre, L. Americh, L. Aguilar, et al., IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. 104 (2007) 282–287. doi:10.1073/pnas.0606854104.
- [109] A. Kuchler, J. Pollheimer, J. Balogh, ScienceDirect - The American Journal of Pathology : Nuclear Interleukin-33 Is Generally Expressed in Resting Endothelium but Rapidly Lost upon Angiogenic or Proinflammatory Activation, American Journal of ..., 2008.
- [110] C. Moussion, N. Ortega, J.-P. Girard, The IL-1-like cytokine IL-33 is constitu-

- tively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? PLoS ONE. 3 (2008) e3331. doi:10.1371/journal.pone.0003331.
- [111] E.S. Bækkevold, M. Roussigné, T. Yamanaka, F.-E. Johansen, F.L. Jahnsen, F. Amalric, et al., Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 69–79. doi:10.1016/S0002-9440(10)63631-0.
- [112] R. Kakkar, H. Hei, S. Dobner, R.T. Lee, Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 6941–6948. doi:10.1074/jbc.M111.298703.
- [113] S. Sanada, D. Hakuno, L.J. Higgins, E.R. Schreiter, A.N.J. McKenzie, R.T. Lee, IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1538–1549. doi:10.1172/JCI30634.
- [114] S. Ali, M. Huber, C. Kollewe, S.C. Bischoff, W. Falk, M.U. Martin, IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 104 (2007) 18660–18665. doi:10.1073/pnas.0705939104.
- [115] G. Palmer, B.P. Lipsky, M.D. Smithgall, D. Meininger, S. Siu, D. Talabot-Ayer, et al., The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33, *Cytokine.* 42 (2008) 358–364. doi:10.1016/j.cyto.2008.03.008.
- [116] A.A. Chackerian, E.R. Oldham, E.E. Murphy, J. Schmitz, S. Pflanz, R.A. Kastelein, IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex, *J. Immunol.* 179 (2007) 2551–2555.
- [117] D. Xu, Selective Expression of a Stable Cell Surface Molecule on Type 2but Not Type 1Helper T Cells, *Journal of Experimental Medicine.* 187 (1998) 787–794. doi:10.1084/jem.187.5.787.
- [118] M. Löhning, A. Stroehmann, T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function, in: 1998.
- [119] D. Moritz, H. Rodewald, The IL-1 Receptor-Related T1 Antigen Is Expressed on Immature and Mature Mast Cells and on Fetal Blood Mast Cell Progenitors, *The Journal of ...* (1998).
- [120] M.D. Minnich, ST2/T1 Protein Functionally Binds to Two Secreted Proteins from Balb/c 3T3 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells but Does Not Bind Interleukin 1, *Journal of Biological Chemistry.* 270 (1995) 27905–27913. doi:10.1074/jbc.270.46.27905.
- [121] J.L. Slack, Cloning of a Putative Ligand for the T1/ST2 Receptor, *Journal of Biological Chemistry.* 271 (1996) 5784–5789. doi:10.1074/jbc.271.10.5784.
- [122] A.J. Coyle, Crucial Role of the Interleukin 1 Receptor Family Member T1/ST2 in T Helper Cell Type 2mediated Lung Mucosal Immune Responses, *Journal of Experimental Medicine.* 190 (1999) 895–902. doi:10.1084/jem.190.7.895.
- [123] M. Kurowska-Stolarska, P. Kewin, G. Murphy, R.C. Russo, B. Stolarski, C.C. Garcia, et al., IL-33 Induces Antigen-Specific IL-5+ T Cells and Promotes Allergic-Induced Airway Inflammation Independent of IL-4, *The Journal of ...* (2008).
- [124] M.D. Smithgall, M.R. Comeau, B.-R.P. Yoon, D. Kaufman, R. Armitage, D.E. Smith, IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells, *Int. Immunol.* 20 (2008) 1019–1030. doi:10.1093/intimm/dxn060.
- [125] M.K. Koma, D. Xu, Y. Li, IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells - Ko-

- mai-Koma - 2007 - European Journal of Immunology - Wiley Online Library, European Journal of .... (2007).
- [126] E.K. Brint, D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A.N.J. McKenzie, L.A.J. O'Neill, et al., ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 373–379. doi:10.1038/ni1050.
- [127] M.J. Sweet, B.P. Leung, D. Kang, M. Sogaard, K. Schulz, V. Trajkovic, et al., A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression, *J. Immunol.* 166 (2001) 6633–6639.
- [128] M.A. Rank, T. Kobayashi, H. Kozaki, K.R. Bartemes, D.L. Squillace, H. Kita, IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) 1047–1054. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.026.
- [129] A.-G. Besnard, D. Togbe, N. Guillou, F. Erard, V. Quesniaux, B. Ryffel, IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation, *Eur. J. Immunol.* 41 (2011) 1675–1686. doi:10.1002/eji.201041033.
- [130] L.H. Ho, T. Ohno, K. Oboki, N. Kajiwara, H. Suto, M. Iikura, et al., IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-Fc RI signals, *Journal of Leukocyte Biology.* 82 (2007) 1481–1490. doi:10.1189/jlb.0407200.
- [131] D. Moulin, O. Donzé, D. Talabot-Ayer, F. Mézin, G. Palmer, C. Gabay, Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells, *Cytokine.* 40 (2007) 216–225. doi:10.1016/j.cyto.2007.09.013.
- [132] M. Iikura, H. Suto, N. Kajiwara, K. Oboki, T. Ohno, Y. Okayama, et al., IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells, *Lab. Invest.* 87 (2007) 971–978. doi:10.1038/labinvest.3700663.
- [133] Z. Allakhverdi, D.E. Smith, M.R. Comeau, G. Delespesse, Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 2051–2054.
- [134] W.B. Cherry, J. Yoon, K.R. Bartemes, K. Iijima, H. Kita, A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (2008) 1484–1490. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.005.
- [135] M. Suzukawa, R. Koketsu, M. Iikura, S. Nakae, K. Matsumoto, H. Nagase, et al., Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils, *Lab. Invest.* 88 (2008) 1245–1253. doi:10.1038/labinvest.2008.82.
- [136] T. Pecaric-Petkovic, S.A. Didichenko, S. Kaempfer, N. Spiegl, C.A. Dahinden, Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33, *Blood.* 113 (2009) 1526–1534. doi:10.1182/blood-2008-05-157818.
- [137] Y.-S. Choi, H.-J. Choi, J.-K. Min, B.-J. Pyun, Y.-S. Maeng, H. Park, et al., Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production, *Blood.* 114 (2009) 3117–3126. doi:10.1182/blood-2009-02-203372.
- [138] A. Yagami, K. Orihara, H. Morita, K. Futamura, N. Hashimoto, K. Matsumoto, et al., IL-33 Mediates Inflammatory Responses in Human Lung Tissue Cells, *The Journal of Immunology.* 185 (2010) 5743–5750. doi:10.4049/jimmunol.0903818.
- [139] K. Yanagisawa, T. Takagi, T. Tsukamoto, T. Tetsuka, ScienceDirect - FEBS Letters : Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1, *FEBS Letters.* (1993).
- [140] S.I. TOMINAGA, K. Kuroiwa, K. Tago, H. Iwahana, K. Yanagisawa, N. Komatsu, Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in

- human leukemic cell line UT-7/GM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 (1999) 14–18. doi:10.1006/bbrc.1999.1469.
- [141] K. Tago, T. Noda, M. HAYAKAWA, H. Iwahana, K. Yanagisawa, T. Yashiro, et al., Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 1377–1383. doi:10.1006/bbrc.2001.5306.
- [142] H. Iwahana, M. HAYAKAWA, K. Kuroiwa, K. Tago, K. Yanagisawa, S. NOJI, et al., Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 1681 (2004) 1–14. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.08.013.
- [143] G. Bergers, A. Reikerstorfer, S. Braselmann, P. Graninger, M. Busslinger, Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor, *Embo J.* 13 (1994) 1176–1188.
- [144] H. Iwahana, K. Yanagisawa, Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells - Iwahana - 2001 - *European Journal of Biochemistry* - Wiley Online Library, *European Journal* .... (1999).
- [145] S. Lécart, N. Lecointe, A. Subramaniam, Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1 and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface - Lécart - 2002 - *European Journal of Immunology* - Wiley Online Library, *European Journal of* .... (2002).
- [146] M. Shimizu, A. Matsuda, K. YANAGISAWA, T. Hirota, M. Akahoshi, N. Inomata, et al., Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2919–2927. doi:10.1093/hmg/ddi323.
- [147] K. Oshikawa, K. Yanagisawa, S. Tominaga, Y. Sugiyama, Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation, *Clin Exp Allergy.* 32 (2002) 1520–1526.
- [148] H. Hayakawa, M. HAYAKAWA, A. Kume, S.I. TOMINAGA, Soluble ST2 Blocks Interleukin-33 Signaling in Allergic Airway Inflammation, *Journal of Biological Chemistry.* 282 (2007) 26369–26380. doi:10.1074/jbc.M704916200.
- [149] D. Préfontaine, S. Lajoie-Kadoch, S. Foley, S. Audusseau, R. Olivenstein, A.J. Halayko, et al., Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells, *The Journal of Immunology.* 183 (2009) 5094–5103. doi:10.4049/jimmunol.0802387.
- [150] D. Préfontaine, J. Nadigel, F. Chouiali, S. Audusseau, A. Semlali, J. Chakir, et al., Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) 752–754. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.935.
- [151] K. OSHIKAWA, K. KUROIWA, K. TAGO, H. IWAHANA, K. YANAGISAWA, S. OHNO, et al., Elevated Soluble ST2 Protein Levels in Sera of Patients with Asthma with an Acute Exacerbation, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 164 (2001) 277.
- [152] R.T.-M.M. PhD, Y.O. MD, K.M.M. PhD, N.K.M. PhD, Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis, *Journal of American Dermatology.* 70 (2014) 882–888. doi:10.1016/j.jaad.2014.01.867.
- [153] J. Glück, B. Rymarczyk, B. Rogala, Serum IL-33 but not ST2 level is elevated in intermittent allergic rhinitis and is a marker of the disease severity, *Inflamm Res.* 61 (2012) 547–550. doi:10.1007/s00011-012-0443-9.
- [154] D. Asaka, M. Yoshikawa, T. Nakayama, T. Yoshimura, H. Moriyama, N. Otori,

- Elevated levels of interleukin-33 in the nasal secretions of patients with allergic rhinitis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 158 Suppl 1 (2012) 47–50. doi:10.1159/000337764.
- [155] K. Sahlander, K. Larsson, L. Palmberg, Increased serum levels of soluble ST2 in birch pollen atopics and individuals working in laboratory animal facilities, *J. Occup. Environ. Med.* 52 (2010) 214–218. doi:10.1097/JOM.0b013e3181d09868.
- [156] Y. Haenuki, K. Matsushita, S. Futatsugi-Yumikura, K.J. Ishii, T. Kawagoe, Y. Imoto, et al., A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 130 (2012) 184–194.e11. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.013.
- [157] C. Beltrán, L. Núñez, Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease - Beltrán - 2009 - *Inflammatory Bowel Diseases* - Wiley Online Library, *Inflammatory Bowel ...* (2010).
- [158] Y. MATSUYAMA, H. OKAZAKI, H. TAMEMOTO, H. KIMURA, Y. KAMATA, K. NAGATANI, et al., Increased Levels of Interleukin 33 in Sera and Synovial Fluid from Patients with Active Rheumatoid Arthritis, *The Journal of Rheumatology*. 37 (2009) 18–25. doi:10.3899/jrheum.090492.
- [159] Y.-S. Hong, S.-J. Moon, Y.-B. Joo, C.-H. Jeon, M.-L. Cho, J.H. Ju, et al., Measurement of Interleukin-33 (IL-33) and IL-33 Receptors (sST2 and ST2L) in Patients with Rheumatoid Arthritis, *J. Korean Med. Sci.* 26 (2011) 1132–1139. doi:10.3346/jkms.2011.26.9.1132.
- [160] D. Díaz-Jiménez, L.E. Núñez, C.J. Beltrán, E. Candia, C. Suazo, M. Alvarez-Lobos, et al., Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis, *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 2181–2190. doi:10.3748/wjg.v17.i17.2181.
- [161] R. Kakkar, R.T. Lee, The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker, *Nat Rev Drug Discov.* 7 (2008) 827–840. doi:10.1038/nrd2660.
- [162] I.S. Wood, B. Wang, P. Trayhurn, IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (2009) 105–109. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.081.
- [163] E.O. Weinberg, M. Shimpo, S. Hurwitz, S.-I. TOMINAGA, J.-L. Rouleau, R.T. Lee, Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker, *Circulation*. 107 (2003) 721–726.
- [164] K.B. Shah, W.J. Kop, R.H. Christenson, D.B. Diercks, S. Henderson, K. Hanson, et al., Prognostic utility of ST2 in patients with acute dyspnea and preserved left ventricular ejection fraction, *Clin. Chem.* 57 (2011) 874–882. doi:10.1373/clinchem.2010.159277.
- [165] D.F. Fiorentino, M.W. Bond, T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones, *J. Exp. Med.* 170 (1989) 2081–2095.
- [166] O. Akbari, G.J. Freeman, E.H. Meyer, E.A. Greenfield, Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity, *Nature*. (2002).
- [167] O. Akbari, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu, Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 725–731. doi:10.1038/90667.
- [168] G. Trinchieri, Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection, *J. Exp. Med.* 194 (2001) F53–7.
- [169] K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, A. O'Garra, I NTERLEUKIN-

- 10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- [170] G. Grünig, D.B. Corry, M.W. Leach, B.W. Seymour, V.P. Kurup, D.M. Rennick, Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1089–1099.
- [171] G.F. Del Prete, M. De Carli, M.M. D'Elia, P. Maestrelli, M. Ricci, L. Fabbri, et al., Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 1445–1449. doi:10.1002/eji.1830230707.
- [172] G. Hansen, G. Berry, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu, Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 175–183. doi:10.1172/JCI5155.
- [173] D.A. Randolph, C.J. Carruthers, S.J. Szabo, K.M. Murphy, D.D. Chaplin, Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma, *J. Immunol.* 162 (1999) 2375–2383.
- [174] I. Bellinghausen, B. Klostermann, J. Knop, J. Saloga, Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 111 (2003) 862–868. doi:10.1067/mai.2003.1412.
- [175] M. Bonvalet, H. Moussu, E. Wambre, C. Ricarte, S. Horiot, A.-C. Rimaniol, et al., Allergen-specific CD4+ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy, *Clin Exp Allergy.* 42 (2012) 1745–1755. doi:10.1111/cea.12015.
- [176] W. Lou, C. Wang, Y. Wang, D. Han, L. Zhang, Responses of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) and IL-10-secreting type 1 T regulatory cells to cluster-specific immunotherapy for allergic rhinitis in children, *Pediatr Allergy Immunol.* 23 (2012) 140–149. doi:10.1111/j.1399-3038.2011.01249.x.
- [177] M. Jutel, M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszczyk, K. Blaser, et al., IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1205–1214. doi:10.1002/eji.200322919.
- [178] B. Gaglani, L. Borish, B.L.B. Bartelson, A. Buchmeier, L. Keller, H.S. Nelson, Nasal Immunotherapy in Weed-Induced Allergic Rhinitis, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 79 (1997) 259–265. doi:10.1016/S1081-1206(10)63012-8.
- [179] K. Nakamura, A. Kitani, W. Strober, Cell Contact-Dependent Immunosuppression by Cd4+Cd25+Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor  $\beta$ , (2001).
- [180] M.K. Levings, R. Sangregorio, C. Sartirana, A.L. Moschin, M. Battaglia, P.C. Orban, et al., Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1335–1346.
- [181] S. Laberge, P. Ernst, O. Ghaffar, W.W. Cruikshank, H. Kornfeld, D.M. Center, et al., Increased Expression of Interleukin-16 in Bronchial Mucosa of Subjects with Atopic Asthma, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 17 (1997) 193.
- [182] J.K. Franz, S.A. Kolb, K.M. Hummel, F. Lahrtz, M. Neidhart, W.K. Aicher, et al., Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998)

- 2661–2671. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2661::AID-IMMU2661>3.0.CO;2-N.
- [183] G.L. Chupp, E.A. Wright, D. Wu, M. Vallen-Mashikian, W.W. Cruikshank, D.M. Center, et al., Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16, *J. Immunol.* 161 (1998) 3114–3119.
- [184] V. Rumsaeng, W.W. Cruikshank, B. Foster, C. Prussin, A.S. Kirshenbaum, T.A. Davis, et al., Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16, *The Journal of ...* (1997).
- [185] A. Kaser, S. Dunzendorfer, F.A. Offner, T. Ryan, A. Schwabegger, W.W. Cruikshank, et al., A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells, *J. Immunol.* 163 (1999) 3232–3238.
- [186] A. Kaser, S. Dunzendorfer, F.A. Offner, O. Ludwiczek, B. Enrich, R.O. Koch, et al., B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells, *J. Immunol.* 165 (2000) 2474–2480.
- [187] S. Laberge, S. Pinsonneault, P. Ernst, R. Olivenstein, O. Ghaffar, D.M. Center, et al., Phenotype of IL-16-producing cells in bronchial mucosa: evidence for the human eosinophil and mast cell as cellular sources of IL-16 in asthma, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119 (1999) 120–125.
- [188] D.M. Center, W. Cruikshank, Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells, *J. Immunol.* 128 (1982) 2563–2568.
- [189] W.W. Cruikshank, J.S. Berman, A.C. Theodore, J. Bernardo, D M Center, Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes, *The Journal of ...* (1987).
- [190] T.H. Rand, CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration, *Journal of Experimental Medicine.* 173 (1991) 1521–1528. doi:10.1084/jem.173.6.1521.
- [191] M.V. Mashikian, R.E. Tarpy, J.J. Saukkonen, K.G. Lim, ScienceDirect.com - Journal of Allergy and Clinical Immunology - Identification of IL-16 as the lymphocyte chemotactic activity in the bronchoalveolar lavage fluid of histamine-challenged asthmatic patients, *Journal of Allergy and ...* (1998).
- [192] S. Laberge, O. Ghaffar, M. BOGUNIEWICZ, D. CENTER, D. LEUNG, Q. HAMID, Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis☆☆☆☆, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 102 (1998) 645–650. doi:10.1016/S0091-6749(98)70282-9.
- [193] A. Bellini, H. Yoshimura, E. Vittori, M. Marini, S. Mattoli, Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 92 (1993) 412–424.
- [194] W.W. Cruikshank, A. Long, R.E. Tarpy, H. Kornfeld, M.P. Carroll, L. Teran, et al., Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 13 (1995) 738–747. doi:10.1165/ajrcmb.13.6.7576712.
- [195] S. Laberge, S. Pinsonneault, E.M. Varga, S.J. Till, K. Nouri-Aria, M. Jacobson, et al., Increased expression of IL-16 immunoreactivity in bronchial mucosa after segmental allergen challenge in patients with asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 293–301. doi:10.1067/mai.2000.108112.

- [196] M.F. Kramer, P. Ostertag, E. Pfrogner, G. Rasp, Nasal IL-16 and MIP-1 alpha in late-phase allergic response, *Allergy Asthma Proc.* 22 (2001) 127–132.
- [197] T. Pullerits, A. Lindén, C. Malmhäll, J. Lötval, Effect of seasonal allergen exposure on mucosal IL-16 and CD4+ cells in patients with allergic rhinitis, *Allergy*. 56 (2001) 871–877. doi:10.1111/j.1398-9995.2001.00916.x.
- [198] M. Karaki, H. Dobashi, R. Kobayashi, M. Tokuda, T. Ishida, N. Mori, Expression of interleukin-16 in allergic rhinitis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 138 (2005) 67–72. doi:10.1159/000087359.
- [199] S.T. Holgate, R. Polosa, Treatment strategies for allergy and asthma, *Nat Rev Immunol.* 8 (2008) 218–230. doi:10.1038/nri2262.
- [200] R. Baumann, M. Rabaszowski, I. Stenin, L. Tilgner, M. Gaertner-Akerboom, K. Scheckenbach, et al., Nasal levels of soluble IL-33R ST2 and IL-16 in allergic rhinitis: inverse correlation trends with disease severity, *Clinical & Experimental Allergy*. (2013) n/a–n/a. doi:10.1111/cea.12148.
- [201] G.A. Flórez-Moreno, D.M. Isaza-Guzmán, Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement, *American Journal of ...* (2013).
- [202] S. Theoleyre, Y. Wittrant, S.K. Tat, Y. Fortun, F. Redini, D. Heymann, The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathological bone remodeling, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 457. doi:10.1016/j.ajodo.2012.08.026.
- [203] N. Bostanci, T. İlgenli, G. Emingil, B. Afacan, B. Han, H. Töz, et al., Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio, *J Clin Periodontol.* 34 (2007) 370–376. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01061.x.
- [204] M. Wagenmann, L. Schumacher, C. Bachert, The time course of the bilateral release of cytokines and mediators after unilateral nasal allergen challenge, *Allergy*. 60 (2005) 1132–1138. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00867.x.
- [205] M. Ali, G. Zhang, W.R. Thomas, C.J. McLean, J.A. Bizzintino, I.A. Laing, et al., Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children, *Tissue Antigens*. 73 (2009) 206–212. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01185.x.
- [206] M. Kurokawa, S. Matsukura, M. Kawaguchi, K. Ieki, S. Suzuki, M. Odaka, et al., Expression and Effects of IL-33 and ST2 in Allergic Bronchial Asthma: IL-33 Induces Eotaxin Production in Lung Fibroblasts, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155 (2011) 12–20. doi:10.1159/000327259.
- [207] K. Hoshino, S. Kashiwamura, K. Kuribayashi, T. Kodama, T. Tsujimura, K. Nakanishi, et al., The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1541–1548.
- [208] M.J. Townsend, P.G. Fallon, D.J. Matthews, H.E. Jolin, A.N. McKenzie, T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1069–1076.
- [209] N.E. Mangan, A. Dasvarma, A.N.J. McKenzie, P.G. Fallon, T1/ST2 expression on Th2 cells negatively regulates allergic pulmonary inflammation, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 1302–1312. doi:10.1002/eji.200636520.
- [210] Y.H. Kim, T.Y. Yang, C.-S. Park, S.-H. Ahn, B.K. Son, J.H. Kim, et al., Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis, *Allergy*. (2011). doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02735.x.
- [211] X. Liu, M. Li, Y. Wu, Y. Zhou, L. Zeng, T. Huang, Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma, *Bio-*

- chem. Biophys. Res. Commun. 386 (2009) 181–185.  
doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.008.
- [212] J. Seok, H.S. Warren, A.G. Cuenca, M.N. Mindrinos, H.V. Baker, W. Xu, et al., Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* (2013). doi:10.1073/pnas.1222878110.
- [213] M.C. Scavuzzo, V. Rocchi, B. Fattori, F. Ambrogi, A. Carpi, R. Ruffoli, et al., Cytokine secretion in nasal mucus of normal subjects and patients with allergic rhinitis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57 (2003) 366–371.  
doi:10.1016/S0753-3322(03)00097-0.
- [214] G. Ciprandi, I. Cirillo, A. Vizzaccaro, M. Milanese, M.A. Tosca, Nasal Obstruction in Patients with Seasonal Allergic Rhinitis: Relationships between Allergic Inflammation and Nasal Airflow, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134 (2004) 34–40.  
doi:10.1159/000077531.
- [215] E.M. Erin, A.S. Zacharasiewicz, G.C. Nicholson, A.J. Tan, L.A. Higgins, T.J. Williams, et al., Topical corticosteroid inhibits interleukin-4, -5 and -13 in nasal secretions following allergen challenge, *Clin Exp Allergy*. 35 (2005) 1608–1614.  
doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02381.x.
- [216] M. Benson, I.-L. Strannegård, G. Wennergren, Ö. Strannegård, Cytokines in nasal fluids from school children with seasonal allergic rhinitis - Benson - 2007 - *Pediatric Allergy and Immunology - Wiley Online Library, Pediatric Allergy and ...* 8 (1997) 143–149. doi:10.1111/j.1399-3038.1997.tb00168.x.
- [217] R. Baumann, M. Rabaszowski, I. Stenin, L. Tilgner, K. Scheckenbach, J. Wiltfang, et al., Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge, *Am J Rhinol Allergy*. 27 (2013) 266–272. doi:10.2500/ajra.2013.27.3913.
- [218] B.L.K.C. MD, P. Matthew J Edwards MSc, B.S. MSc, P. Christoph Walker MSc, G.C.N. BSc, A.J. Tan, et al., A novel method for assessing unchallenged levels of mediators in nasal epithelial lining fluid, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) 1387–1389.e3. doi:10.1016/j.jaci.2010.01.039.
- [219] M. Gröger, C. Klemens, S. Wendt, S. Becker, M. Canis, M. Havel, et al., Mediators and cytokines in persistent allergic rhinitis and nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 159 (2012) 171–178.  
doi:10.1159/000336169.
- [220] G. Le Gros, S.Z. Ben-Sasson, R. Seder, F.D. Finkelman, W.E. Paul, Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 921–929. doi:10.1084/jem.172.3.921.
- [221] S.L. Swain, A.D. Weinberg, M. English, G. Huston, IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors, *The Journal of ...* (1990).
- [222] P. Bradding, Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells, *Journal of Experimental Medicine*. 176 (1992) 1381–1386.  
doi:10.1084/jem.176.5.1381.
- [223] P. Bradding, I.H. Feather, S. Wilson, P.G. Bardin, C.H. Heusser, S.T. Holgate, et al., Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation, *The Journal of ...* (1993).
- [224] D. Jankovic, M.C. Kullberg, N. Noben-Trauth, P. Caspar, W.E. Paul, A. Sher, Single Cell Analysis Reveals That IL-4 Receptor/Stat6 Signaling Is Not Required for the In Vivo or In Vitro Development of CD4+ Lymphocytes with a Th2 Cytokine Profile, *The Journal of ...* (2000).

- [225] S. Tanaka, Y. Motomura, Y. Suzuki, R. Yagi, H. Inoue, S. Miyatake, et al., The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated IL4 transcription in TH2 cells, *Nat. Immunol.* 12 (2010) 77–85. doi:10.1038/ni.1966.
- [226] C.J. Oliphant, J.L. Barlow, A.N.J. McKenzie, Insights into the initiation of type 2 immune responses, *Immunology.* 134 (2011) 378–385. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03499.x.
- [227] D.R. Neill, S.H. Wong, A. Bellosi, R.J. Flynn, M. Daly, T.K.A. Langford, et al., Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity, *Nature.* 464 (2010) 1367–1370. doi:10.1038/nature08900.
- [228] D.R.D. Neill, A.N.J.A. McKenzie, Nuocytes and beyond: new insights into helminth expulsion, *Trends Parasitol.* 27 (2011) 8–8. doi:10.1016/j.pt.2011.01.001.
- [229] J.L. Barlow, A.N.J. McKenzie, Nuocytes: expanding the innate cell repertoire in type-2 immunity, *Journal of Leukocyte Biology.* 90 (2011) 867–874. doi:10.1189/jlb.0311160.
- [230] J.L. Barlow, A. Bellosi, C.S. Hardman, L.F. Drynan, S.H. Wong, J.P. Cruickshank, et al., Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 191–8.e1–4. doi:10.1016/j.jaci.2011.09.041.
- [231] M. Icutani, T. Yanagibashi, M. Ogasawara, K. Tsuneyama, S. Yamamoto, Y. Hattori, et al., Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity, *The Journal of Immunology.* 188 (2012) 703–713. doi:10.4049/jimmunol.1101270.
- [232] E.D. Wright, P. Christodoulopoulos, P. Small, S. Frenkiel, Q. HAMID, Th-2 type cytokine receptors in allergic rhinitis and in response to topical steroids, *Laryngoscope.* 108 (1998) 1528–1533.
- [233] M. Benson, G. Wennergren, M. Fransson, L.O. Cardell, Altered levels of the soluble IL-1, IL-4 and TNF receptors, as well as the IL-1 receptor antagonist, in intermittent allergic rhinitis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134 (2004) 227–232. doi:10.1159/000078770.
- [234] M. Benson, I.-L. Strannegård, G. Wennergren, Ö. Strannegård, Increase of the soluble IL-4 receptor (IL-4sR) and positive correlation between IL-4sR and IgE in nasal fluids from school children with allergic rhinitis, *Allergy Asthma Proc.* 21 (2000) 89–95.
- [235] A.M. Vasiliev, R.N. Vasilenko, N.L. Kulikova, S.M. Andreev, I.O. Chikileva, G.Y. Puchkova, et al., Structural and Functional Properties of IL-4 $\delta$ 2, an Alternative Splice Variant of Human IL-4, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 273–281. doi:10.1021/pr025586y.
- [236] I.G. Luzina, V. Locketell, S. Lavania, E.M. Pickering, P.H. Kang, Y.N. Bashkatova, et al., Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma, *Cytokine.* 58 (2012) 20–26. doi:10.1016/j.cyto.2011.12.017.
- [237] E.M. Glare, M. Divjak, J.M. Rolland, E.H. Walters, Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4 $\delta$ 2, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 978–982.
- [238] C.K. Wong, C.Y. Ho, F.W. Ko, C.H. Chan, A.S. Ho, D.S. Hui, et al., Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma - Wong - 2001 - *Clinical & Experimental Immunology* - Wiley Online Library, *Clin. Exp. Immunol.* 125 (2001) 177–183.
- [239] S. TILL, S. Durham, R. DICKASON, D. HUSTON, J. BUNGRE, S. WALKER,

- et al., IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression, *Immunology*. 91 (1997) 53–57. doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00218.x.
- [240] Y. Li, F.E.R. Simons, K.T. HayGlass, Environmental Antigen-Induced IL-13 Responses Are Elevated Among Subjects with Allergic Rhinitis, Are Independent of IL-4, and Are Inhibited by Endogenous IFN- $\gamma$  Synthesis, *The Journal of Immunology*. (1998).
- [241] A. KleinJan, M.D. Dijkstra, S.S. Boks, L.A. Severijnen, P.G. Mulder, W.J. Fokkens, Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 441–450.
- [242] O. Ghaffar, S. Laberge, M.R. Jacobson, O. Lowhagen, S. Rak, S.R. Durham, et al., IL-13 mRNA and immunoreactivity in allergen-induced rhinitis: comparison with IL-4 expression and modulation by topical glucocorticoid therapy, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 17 (1997) 17–24.
- [243] E.M. Erin, B.R. Leaker, A.S. Zacharasiewicz, L.A. Higgins, T.J. Williams, M.J. Boyce, et al., Single dose topical corticosteroid inhibits IL-5 and IL-13 in nasal lavage following grass pollen challenge, *Allergy*. 60 (2005) 1524–1529. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00928.x.
- [244] R. Baumann, M. Rabaszowski, I. Stenin, The release of IL-31 and IL-13 after nasal allergen challenge and their relation to nasal symptoms, *Clinical & ...* (2012).
- [245] M.G. Karlsson, A. Davidsson, G. Viale, D. Graziani, H.B. Hellquist, Nasal messenger RNA expression of interleukins 2, 4, and 5 in patients with allergic rhinitis, *Diagn. Mol. Pathol.* 4 (1995) 85–92.
- [246] K. Masuyama, S. TILL, M. Jacobson, A. KAMIL, L. Cameron, S. Juliusson, et al., Nasal eosinophilia and IL-5 mRNA expression in seasonal allergic rhinitis induced by natural allergen exposure: Effect of topical corticosteroids☆☆☆☆, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 102 (1998) 610–617. doi:10.1016/S0091-6749(98)70277-5.
- [247] M.F. Kramer, P. Ostertag, E. Pfrogner, G. Rasp, Nasal interleukin-5, immunoglobulin E, eosinophilic cationic protein, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis, *Laryngoscope*. 110 (2000) 1056–1062. doi:10.1097/00005537-200006000-00031.
- [248] G. CIPRANDI, M. Tosca, V. RICCA, G. Passalacqua, A.M. Riccio, M. BAGNASCO, et al., Cetirizine treatment of rhinitis in children with pollen allergy: evidence of its antiallergic activity, *Clin Exp Allergy*. 27 (1997) 1160–1166. doi:10.1111/j.1365-2222.1997.tb01153.x.
- [249] F.E.S.F.T.J.K.T.H. M Imada, Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls, *Immunology*. 85 (1995) 373.
- [250] E.A. Wierenga, M. Snoek, C. de Groot, I. Chretien, J.D. Bos, H.M. Jansen, et al., Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2<sup>+</sup> T lymphocytes in atopic patients, *J. Immunol.* 144 (1990) 4651–4656.
- [251] P. Parronchi, D. Macchia, M.P. Piccinni, P. Biswas, C. Simonelli, E. Maggi, et al., Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 88 (1991) 4538–4542. doi:10.1073/pnas.88.10.4538.
- [252] P.A. Wachholz, K.N. Aria, D.R. Wilson, Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1 : Th2 cyto-

- kin ratios - Wachholz - 2002 - Immunology - Wiley Online Library, .... (2002).
- [253] S. Durham, Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- $\gamma$ ☆☆☆★★, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 97 (1996) 1356–1365. doi:10.1016/S0091-6749(96)70205-1.
- [254] B. Muller, E.J.J. de Groot, I.J.M. Kortekaas, W.J. Fokkens, C.M. van Drunen, Nasal endothelial interleukin-10 expression is negatively correlated with nasal symptoms after allergen provocation, *Allergy*. 64 (2009) 738–745. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01860.x.
- [255] B. Muller, E.J.J. de Groot, I.J.M. Kortekaas, W.J. Fokkens, C.M. van Drunen, Nasal epithelial cells express IL-10 at levels that negatively correlate with clinical symptoms in patients with house dust mite allergy, *Allergy*. 62 (2007) 1014–1022. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01419.x.
- [256] N. Terada, N. Hamano, W.J. Kim, K. Hirai, T. Nakajima, H. Yamada, et al., The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid: its key role in eosinophil recruitment in nasal mucosa, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 164 (2001) 575–579. doi:10.1164/ajrccm.164.4.2009046.
- [257] S. Laberge, S.R. Durham, O. Ghaffar, S. Rak, D.M. Center, M. Jacobson, et al., Expression of IL-16 in allergen-induced late-phase nasal responses and relation to topical glucocorticosteroid treatment☆☆☆★★◇, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 100 (1997) 569–574. doi:10.1016/S0091-6749(97)70152-0.
- [258] E. Van Coillie, J. Van Damme, G. Opdenakker, The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines, *Cytokine Growth Factor Rev*. 10 (1999) 61–86. doi:10.1016/S1359-6101(99)00005-2.
- [259] J. Elsner, S. Escher, Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases - Elsner - 2004 - Allergy - Wiley Online Library, *Allergy*. (2004).
- [260] S. Ying, D.S. Robinson, Q. Meng, J. Rottman, R. Kennedy, D.J. Ringler, et al., Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells, *Eur. J. Immunol*. 27 (1997) 3507–3516. doi:10.1002/eji.1830271252.
- [261] N. Yawalkar, M. Ugucioni, J. Scharer, J. Braunwalder, S. Karlen, B. Dewald, et al., Enhanced Expression of Eotaxin and CCR3 in Atopic Dermatitis, *Journal of Investigative Dermatology*. 113 (1999) 43–48. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00619.x.
- [262] J.N. Francis, C.M. Lloyd, I. Sabroe, S.R. Durham, S.J. Till, T lymphocytes expressing CCR3 are increased in allergic rhinitis compared with non-allergic controls and following allergen immunotherapy, *Allergy*. 62 (2007) 59–65. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01253.x.
- [263] T. Pullerits, A. Lindén, L. Praks, Upregulation of nasal mucosal eotaxin in patients with allergic rhinitis during grass pollen season: effect of a local glucocorticoid - Pullerits - 2002 - Clinical & Experimental Allergy - Wiley Online Library, *Clinical & ...* (2000).
- [264] M. Kitaura, N. Suzuki, T. Imai, S. Takagi, R. Suzuki, T. Nakajima, et al., Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3, *J. Biol. Chem*. 274 (1999) 27975–27980.
- [265] J. Elsner, R. Höchstetter, D. Kimmig, A. KAPP, Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils, *Eur. J. Immunol*. 26

- (1996) 1919–1925. doi:10.1002/eji.1830260837.
- [266] A. Shinkai, H. Yoshisue, M. Koike, E. Shoji, S. Nakagawa, A. Saito, et al., A Novel Human CC Chemokine, Eotaxin-3, Which Is Expressed in IL-4-Stimulated Vascular Endothelial Cells, Exhibits Potent Activity Toward Eosinophils, (1999).
- [267] J.R. White, C. Imburgia, E. Dul, E. Appelbaum, K. O'Donnell, D.J. O'Shannessy, et al., Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils, *Journal of Leukocyte Biology*. 62 (1997) 667–675.
- [268] A. Burke-Gaffney, P.G. Hellewell, Eotaxin stimulates eosinophil adhesion to human lung microvascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227 (1996) 35–40. doi:10.1006/bbrc.1996.1463.
- [269] R.T. Palframan, P.D. Collins, T.J. Williams, S.M. Rankin, Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow, *Blood*. 91 (1998) 2240–2248.
- [270] P.D. Ponath, S. Qin, D.J. Ringler, I. Clark-Lewis, J. Wang, N. Kassam, et al., Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 604–612. doi:10.1172/JCI118456.
- [271] E.A. Garcia-Zepeda, M.E. Rothenberg, R.T. Ownbey, J. Celestin, P. Leder, A.D. Luster, Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia, *Nat. Med.* 2 (1996) 449–456. doi:10.1038/nm0496-449.
- [272] T. Fujisawa, Y. Kato, H. Nagase, J. Atsuta, ScienceDirect - *Journal of Allergy and Clinical Immunology* : Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3, *Journal of Allergy and ...* (2000).
- [273] J.-C. Gutierrez-Ramos, C. Lloyd, J.A. Gonzalo, Eotaxin: from an eosinophilic chemokine to a major regulator of allergic reactions, *Immunology Today*. 20 (1999) 500–504. doi:10.1016/S0167-5699(99)01522-4.
- [274] T. LM, M. M, B. J, V. EL, N. T, H. K, et al., Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 20 (1999) 777–786.
- [275] M.E. Banwell, N.S. Tolley, T.J. Williams, T.J. Mitchell, REGULATION OF HUMAN EOTAXIN-3/CCL26 EXPRESSION: MODULATION BY CYTOKINES AND GLUCOCORTICOIDS, *Cytokine*. 17 (2002) 317–323. doi:10.1006/cyto.2002.1021.
- [276] S. KAGAMI, H. Saeki, M. Komine, T. Kakinuma, Y. Tsunemi, K. Nakamura, et al., Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells, *Clin. Exp. Immunol.* 141 (2005) 459–466. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02875.x.
- [277] S. Ying, Q. Meng, K. Zeibecoglou, D.S. Robinson, A. Macfarlane, M. Humbert, et al., Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics, *J. Immunol.* 163 (1999) 6321–6329.
- [278] S. Ying, D.S. Robinson, Q. Meng, L.T. Barata, A.R. McEuen, M.G. Buckley, et al., C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophil-

- ia, and relationship to basophils and other C-C chemokines (monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES), *J. Immunol.* 163 (1999) 3976–3984.
- [279] N. Berkman, S. Ohnona, F.K. Chung, R. Breuer, Eotaxin-3 but not eotaxin gene expression is upregulated in asthmatics 24 hours after allergen challenge, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 24 (2001) 682.
- [280] L. Greiff, H. Petersen, E. Mattsson, M. Andersson, J.S. Erjefalt, M. Linden, et al., Mucosal output of eotaxin in allergic rhinitis and its attenuation by topical glucocorticosteroid treatment, *Clin Exp Allergy.* 31 (2001) 1321–1327. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01029.x.
- [281] R.J. Salib, L.C. Lau, P.H. Howarth, Nasal lavage fluid concentrations of eotaxin-1 (CCL11) in naturally occurring allergic rhinitis: relationship to disease activity, nasal luminal eosinophil influx, and plasma protein exudation, *Clin Exp Allergy.* 35 (2005) 995–1002. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02236.x.
- [282] M. Uguccioni, Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 2379–2384. doi:10.1084/jem.183.5.2379.
- [283] E. Garcia-Zepeda, C. Combadiere, Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3, *The Journal of ...* (1996).
- [284] C. Stellato, P. Collins, P.D. Ponath, D. Soler, W. Newman, G. La Rosa, et al., Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 926–936. doi:10.1172/JCI119257.
- [285] E.D. Wright, S. Frenkiel, O. Ghaffar, K. al-Ghamdi, A. LUSTER, D. Miotto, et al., Monocyte chemotactic protein expression in allergy and non-allergy-associated chronic sinusitis, *J Otolaryngol.* 27 (1998) 281–287.
- [286] R. TAHA, E. MINSHALL, D. LEUNG, M. BOGUNIEWICZ, A. LUSTER, S. MURO, et al., Evidence for increased expression of eotaxin and monocyte chemotactic protein-4 in atopic dermatitis\*, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 105 (2000) 1002–1007. doi:10.1067/mai.2000.106483.
- [287] D. Miotto, P. Christodoulopoulos, R. Olivenstein, ScienceDirect - *Journal of Allergy and Clinical Immunology* : Expression of IFN- $\gamma$ -inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in TH1- and TH2-mediated lung diseases, *Journal of Allergy and ...* (2001).
- [288] P. Loetscher, M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, et al., CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes, *Nature.* 391 (1998) 344–345. doi:10.1038/34812.
- [289] G. Bernardini, J. Hedrick, S. Sozzani, W. Luini, G. Spinetti, M. Weiss, et al., Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 582–588. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<582::AID-IMMU582>3.0.CO;2-A.
- [290] D.P. Andrew, M.S. Chang, J. McNinch, S.T. Wathen, M. Rihaneck, J. Tseng, et al., STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13, *J. Immunol.* 161 (1998) 5027–5038.
- [291] S. Schrum, P. Probst, B. Fleischer, P.F. Zipfel, Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response, *J. Immunol.* 157 (1996) 3598–3604.

- [292] Y. Tanaka, D.H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist, S. Shaw, T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 $\beta$ , *Nature*. 361 (1993) 79–82. doi:10.1038/361079a0.
- [293] R. Krzysiek, E.A. Lefèvre, W. Zou, A. Foussat, J. Bernard, A. Portier, et al., Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells, *J. Immunol.* 162 (1999) 4455–4463.
- [294] S.F. Ziegler, T.W. Tough, T.L. Franklin, R.J. Armitage, M.R. Alderson, Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7, *J. Immunol.* 147 (1991) 2234–2239.
- [295] A. Oliva, A.L. Kinter, M. Vaccarezza, A. Rubbert, A. Catanzaro, S. Moir, et al., Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 223–231. doi:10.1172/JCI2323.
- [296] J.A. Lapinet, P. Scapini, F. Calzetti, O. Pérez, M.A. Cassatella, Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-8, macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles, *Infection and Immunity*. 68 (2000) 6917–6923.
- [297] F. Sallusto, B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, et al., Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 1617–1625. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3.
- [298] T. Imai, M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, et al., Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine, (1999).
- [299] D.R. Greaves, T. Häkkinen, A.D. Lucas, K. Liddiard, E. Jones, C.M. Quinn, et al., Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 923–929.
- [300] D.S. Faffe, T. Whitehead, P.E. Moore, S. Baraldo, L. Flynt, K. Bourgeois, et al., IL-13 and IL-4 promote TARC release in human airway smooth muscle cells: role of IL-4 receptor genotype, *American Journal of ...* (2003).
- [301] N. Terada, T. Nomura, W.J. Kim, Y. Otsuka, Expression of C–C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines - Terada - 2001 - *Clinical & Experimental Allergy - Wiley Online Library, Clinical & ...* (2001).
- [302] T. Imai, M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, O. Yoshie, The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15036–15042.
- [303] T. Imai, Macrophage-derived Chemokine Is a Functional Ligand for the CC Chemokine Receptor 4, *Journal of Biological Chemistry*. 273 (1998) 1764–1768. doi:10.1074/jbc.273.3.1764.
- [304] P. Panina-Bordignon, A. Papi, M. Mariani, P. Di Lucia, G. Casoni, C. Bellettato, et al., The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1357–1364. doi:10.1172/JCI12655.
- [305] S.J. Roth, M.W. Carr, T.A. Springer, C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon- $\gamma$  inducible protein-10, stimulate transendo-

- thelial chemotaxis of T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 3482–3488.
- [306] V. Gangur, F.E. Simons, K.T. Hayglass, Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN-gamma over IL-4 responses, *Faseb J.* 12 (1998) 705–713.
- [307] D.D. Taub, M. Anver, J.J. Oppenheim, D.L. Longo, W.J. Murphy, T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1931–1941. doi:10.1172/JCI118625.
- [308] M.J. Smyth, C.O. Zachariae, Y. Norihisa, J.R. Ortaldo, A. Hishinuma, K. Matsu-shima, IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets, *J. Immunol.* 146 (1991) 3815–3823.
- [309] A. Möller, U. Lippert, D. Lessmann, G. Kolde, K. Hamann, P. Welker, et al., Human mast cells produce IL-8, *The Journal of ....* (1993).
- [310] G.W. Takahashi, D.3. Andrews, M.B. Lilly, J.W. Singer, M.R. Alderson, Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes, .... (1993).
- [311] S. Yousefi, S. Hemmann, M. Weber, C. Hölzer, K. Hartung, K. BLASER, et al., IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils. Evidence for increased secretion in asthma, *The Journal of ....* (1995).
- [312] R.K. Braun, M. Franchini, F. Erard, S. Rihs, I.J.M. De Vries, K. Blaser, et al., Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 956–960. doi:10.1002/eji.1830230429.
- [313] M. Baggiolini, B. Moser, Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines The Giles Filley Lecture, Chest. (1994).
- [314] H. HOSHI, I. OHNO, M. HONMA, Y. TANNNO, K. YAMAUCHI, G. TAMURA, et al., IL-5, IL-8 and GM-CSF immunostaining of sputum cells in bronchial asthma and chronic bronchitis, *Clin Exp Allergy.* 25 (1995) 720–728. doi:10.1111/j.1365-2222.1995.tb00009.x.
- [315] C. Yamamoto, T. Yoneda, M. Yoshikawa, A. Fu, T. Tokuyama, K. Tsukaguchi, et al., Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8, *Chest.* 112 (1997) 505–510. doi:10.1378/chest.112.2.505.
- [316] G. Ciprandi, M.A. Tosca, M. Milanese, G. Caligo, V. Ricca, Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study, *Pediatr Allergy Immunol.* 15 (2004) 148–151. doi:10.1046/j.1399-3038.2003.00102.x.
- [317] A. Togias, J. Corren, M. Wagenmann, Nasal provocation testing, *Middleton's Allergy Principles and Practice*, 7th Edn. Maryland Heights, MO, USA: Elsevier Inc. (2009) 1281–1294.
- [318] J.T. Connell, Quantitative intranasal pollen challenge: II. Effect of daily pollen challenge, environmental pollen exposure, and placebo challenge on the nasal membrane, *Journal of Allergy.* (1968).
- [319] M. Wachs, D. Proud, L. Lichtenstein, Observations on the pathogenesis of nasal priming, *J Allergy.* (1989).
- [320] M.S. de Bruin-Weller, F.R. Weller, J.G. De Monchy, Repeated allergen challenge as a new research model for studying allergic reactions, *Clin Exp Allergy.* 29 (1999) 159–165.
- [321] D. Wang, P. Clement, J. Smitz, M.P. Derde, Concentrations of chemical mediators in nasal secretions of patients with hay fever during natural allergen exposure, *Acta Otolaryngol.* 114 (1994) 552–555.

- [322] L. Klimek, M. Reichenbach, T. Mewes, W. Mann, [Reproducibility and seasonal dependence of specific intranasal provocation tests in birch pollen allergy patients], *Laryngorhinootologie*. 76 (1997) 475–479. doi:10.1055/s-2007-997463.
- [323] M. Wagenmann, F.M. Baroody, A. Kagey-Sobotka, L.M. Lichtenstein, R.M. Naclerio, The effect of terfenadine on unilateral nasal challenge with allergen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 93 (1994) 594–605.
- [324] L. Klimek, G. Rasp, Norm values for eosinophil cationic protein in nasal secretions: influence of specimen collection, *Clin Exp Allergy*. 29 (1999) 367–374.
- [325] H. Riechelmann, T. Deutschle, E. Friemel, H.-J. Gross, M. Bachem, Biological markers in nasal secretions, *European Respiratory Journal*. 21 (2003) 600–605. doi:10.1183/09031936.03.00072003.
- [326] R. Bascom, U. Pipkorn, D. Proud, S. DUNNETTE, G. GLEICH, L. LICHTENSTEIN, et al., Major basic protein and eosinophil-derived neurotoxin concentrations in nasal-lavage fluid after antigen challenge: Effect of systemic corticosteroids and relationship to eosinophil influx, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 84 (1989) 338–346. doi:10.1016/0091-6749(89)90418-1.
- [327] R. HY, Bronchoalveolar lavage, *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 (1987) 250–263.
- [328] A. Linder, G. Ronquist, H. Deuschl, Random Distribution of Exogenous Lithium in Nasal Secretion and Its Application in Substance Determination, *Acta Otolaryngol.* (1983).
- [329] S.G.R.L.L. A B Cohen, Immunoglobulins in nasal secretions of infants, *Clin. Exp. Immunol.* 6 (1970) 753.

## **Anhang**

Muster des Probandenfragebogens

Muster des Fragebogens der Allergiesprechstunde der HNO-Klinik des UKD

Muster des Skin-Prick-Test Bogens

Muster der Einverständniserklärung

Muster der Patienteninformation

Patientenaufkleber:

**Fragebogen zur Studie über allergische Botenstoffe / allergischer Schnupfen**

Datum:

Geschlecht  weiblich  männlich

Geburtsdatum:  Alter:

**Eingangsvoraussetzungen für die Studie**

Bitte bestätigen

- Wir suchen Probanden
- stimmt 18 Jahre oder älter
  - stimmt mit Heuschnupfen (allergische Rhinitis) und/ohne Asthma bronchiale in der Sommerzeit für eine Studie über allergische Botenstoffe
- Ausschlusskriterien:
- stimmt keine Schwangerschaft, keine Stillzeit
  - stimmt keine schwerwiegende Erkrankungen (Krebs/Tumoren, Autoimmun-/ Infektions-Erkrankungen, AIDS...)
  - stimmt keine Hyposensibilisierung gegen Pollen innerhalb der letzten drei Jahre
  - stimmt keine OP an Nase oder Nasennebenhöhlen in den letzten drei Monaten
  - stimmt keine chronische Nasennebenhöhlenentzündung
  - stimmt keine Medikamenteneinnahme wegen Allergien (Antihistaminika, Steroid-Nasenspray) in den letzten 7 Tagen
  - stimmt keine sonstige Medikamenteneinnahme (Immunsuppressiva, Antidepressiva, ...)

Wenn ein/mehrere Punkt(e) nicht stimmt/stimmen, bitte nicht weiter ausfüllen sondern erst nachfragen. Vielen Dank!

**Haben Sie eine chronische Nasennebenhöhlenentzündung?**

- Nein  Ja Falls Ja, wie wurde Sie diagnostiziert?  
 Haben Sie Nasenpolypen?  Ja  Nein

**Wurden Sie schon im Nasenbereich operiert?**

- Nein  Ja Falls Ja, ...  
 ... welche Operation(en) wurde(n) durchgeführt?

**Hyposensibilisierung**

Falls Sie schon eine (mehrere) Hyposensibilisierung(en) gemacht haben:

- Wogegen?:   
 Wann war Ihre letzte Hyposensibilisierung?  Beginn:  Ende:

**Ist bei Ihnen eine allergische Rhinitis/Heuschnupfen/Pollenallergie festgestellt worden?**

- Nein  Ja Falls Ja, gegen welche Stoffe?
- Bäume  Pilze
  - Gräser  Hausstaubmilben
  - Kräuter  Katze
  - Hund  Pferd
  - Andere
- Falls Andere, welche?
- Wie wurde Ihre Allergie getestet?  Skin-Prick-Test  spezifisches IgE (Blut)  
 nasale Provokation
- Wo wurde Ihre Allergie getestet?  bei uns  anderswo
- Wann wurde Ihre Allergie getestet?  < 1 Jahr  1-2 Jahre  > 2 Jahre



Patientenetikett

# Allergie-Fragebogen

Arzt:

Datum:

## Aktuelle Beschwerden *(Bitte ankreuzen)*

Beschwerden	keine	gering	mäßig	schwer
Verstopfte Nase				
Nasenlaufen				
Schleimbildung im Rachen, Hals				
Niesreiz (Niesanfälle)				
Juckreiz in der Nase				
Rötung, Juckreiz der Augen				
Augentränen				
Husten, Reizhusten				
Asthma, Atemnot, schweres Atmen				
Juckreiz an Lippen, Rachen, Gaumen				
Hautausschlag, Neurodermitis				

Seit wie vielen Jahren bestehen die Symptome? \_\_\_\_\_ Jahre

Zu welcher Tageszeit haben Sie Beschwerden?  nachts  tagsüber

Zu welcher Jahreszeit haben Sie Beschwerden? *(Bitte einkreisen)*:

Jan----Feb----März----Apr----Mai----Juni----Juli----Aug----Sept----Okt----Nov----Dez

Wie häufig haben Sie Beschwerden?  an weniger als 4 Tagen/Woche  an mehr als 4 Tagen/Woche

an weniger als 4 Wochen/Jahr  an mehr als 4 Wochen/Jahr

Haben Sie an bestimmten Orten Beschwerden?

**Bitte kreuzen Sie im Folgenden das Zutreffende an und schreiben Sie genauere Angaben auf:**

Unverträglichkeit von Medikamenten:  Nein  Ja (falls ja, welche?):

---

Unverträglichkeit von Aspirin:  Nein  Ja

Unverträglichkeit von Lebensmitteln:  Nein  Ja (falls ja, welche?):

---

Aufgetretene Beschwerden bei obengenannten Unverträglichkeiten?

---

Welche Medikamente nehmen Sie regelmäßig ein?

---

Frühere Operationen an der Nase oder den Nasennebenhöhlen?  Nein  Ja (falls ja, welche?):

---

Wurde früher bereits ein Allergietest durchgeführt:  Nein  Ja (Zeitpunkt):

---

Welche Allergien wurden früher festgestellt?

---

**Wurde Ihre Allergie bereits mit folgenden Mitteln behandelt?**

Nasenspray:  Nein  Ja

Antihistaminika (antiallergische Tabletten):  Nein  Ja

Hyposensibilisierung („Allergieimpfung“, -spritze):  Nein  Ja Zeitdauer: \_\_\_\_\_Jahre

Haben sich Ihre Beschwerden durch diese Behandlung gebessert?  Nein  Ja

**Frühere Beschwerden:**

Waren in Ihrer **Kindheit** bereits folgende Erkrankungen bekannt?

Allergien:  Nein  Ja

Asthma:  Nein  Ja

Hauterkrankungen:  Nein  Ja

Folgende Behandlung hat stattgefunden:

---

**Haben Blutsverwandte (Eltern, Geschwister, Großeltern) von Ihnen eine der folgenden Beschwerden?**

Allergien  Nein  Ja (Wer, welche?)

---

Asthma :  Nein  Ja (Wer?)

---

Hauterkrankungen  Nein  Ja (z.B. Neurodermitis, Wer?)

---

**Informationen zu Ihrer Wohnsituation:**

Haustiere:  Nein  Ja Welche? (z.B. Hund): \_\_\_\_\_

Teppichboden:  Nein  Ja Zimmer (z.B. Schlafzimmer) : \_\_\_\_\_

Kübelpflanzen:  Nein  Ja Zimmer (z.B. Wohnzimmer): \_\_\_\_\_

Feuchte Stellen, Schimmel:  Nein  Ja Zimmer (z.B. Badezimmer) \_\_\_\_\_

**Teilen Sie uns mit, was Sie zusätzlich für wichtig zur Abklärung Ihrer Allergie halten:**

---

---

---

**Ergebnis Hauttest**

**Allergie-Sprechstunde**

Leiter Priv.-Doz. Dr. M. Wagenmann

**Hals-, Nasen- und Ohrenklinik**

Direktor der Klinik Univ.-Prof. Dr. Jörg Schipper

**Ergebnis spezifisches IgE**

**Ergebnis nasale Provokation**

**Diagnose**

**Procedere**

**Arzt:**

**Datum:**

Datum: \_\_\_\_\_

Untersucher: \_\_\_\_\_

		Prick
1	NaCL	
2	Histamin	
3	Gräser	
4	Bäume I	
5	Bäume II	
6	Pilze I	
7	Pilze II	
8	Roggen	
9	Birke	
10	Hasel	
11	Erle	
12	Wegerich	
13	Beifuß	
14	Brennnessel	
15	Ragweed	
16	Katze	
17	Hund	
18	Alternaria	
19	Cladosporum	
20	Aspergillus	
21	Penicillium	
22	D. farinae	
23	D. pteron.	
24	Lepidoglyphus d.	
25	Acarus siro	
26	Tyrophagus p.	
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		

	Scratch	
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		

Beurteilung	Prick (mm Ø)	
	Quaddel	Erythem
Ø	Ø	<3
+	2-3	3-5
++	3	6-10
+++	4-6	11-20
++++	>6	>20
	Pseudopodien	

**Hals-Nasen-Ohrenklinik**

**Patienteneinwilligung**

Mechanismen der allergischen Rhinitis. Studie zur Untersuchung der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis während der Allergensaison und nach nasaler Allergenprovokation

**Die Teilnahme ist freiwillig**

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf hat der Durchführung dieser Studie in vorliegender Form zugestimmt. Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig und so können Sie die Teilnahme auch ablehnen. Sie können auch jederzeit Ihre Teilnahme beenden – ohne Nachteile für Ihre weitere Behandlung. Außerdem ist es die Pflicht jedes Studienarztes die Studienbehandlung abzubrechen, falls Risiken für Ihre Gesundheit bestehen.

Es ist mir bekannt, dass Informationen über mich gesammelt werden und als Teil dieser Studie analysiert werden. Die Informationen aller Studienteilnehmer werden zusammengefasst. Es ist mir bekannt, dass jede Information, die mich direkt als Individuum identifiziert, in ärztlichen Händen verbleibt und vertraulich behandelt wird. Es ist mir auch bekannt, dass Daten erhoben werden, die mich nicht direkt als Individuum identifizieren (sog. pseudonymisierte Daten). Diese Informationen werden in eine Datenbank eingegeben und werden Teil der zu veröffentlichenden Studienergebnisse sein. Dies hat keine Konsequenz bzgl. des Schutzes meiner persönlichen Daten. Ich habe das Recht jederzeit Einblick in meine Daten zu erhalten, und wenn gerechtfertigt auch Korrekturen anbringen zu lassen.

**Zustimmung**

Ich habe die zugehörige Patientenaufklärung und diese Einwilligungserklärung gelesen und mit meinem Arzt besprochen, dass ich an dieser experimentellen Studie teilnehme. Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich diese jederzeit beenden kann. Dies wird meine zukünftige Behandlung nicht beeinträchtigen. Ich habe eine Kopie dieser Einverständniserklärung erhalten.

- Diese wissenschaftliche Studie wurde mir klar und vollständig erklärt.
- Ich habe ein Exemplar der Patientenaufklärung erhalten. Ich werde eine Kopie der Patientenaufklärung behalten.
- Meine Fragen wurden verständlich und vollständig beantwortet.
- Ich weiß, dass ich jederzeit anrufen kann, sollte ich weitere Fragen oder Probleme haben.
- Die möglichen Vorteile und Nachteile wurden mir erklärt.
- Mir wurde erklärt, dass es sich um keine Behandlungsstudie handelt.
- Ich hatte genug Zeit, über meine Entscheidung nachzudenken.
- Es ist mir bekannt, dass meine Teilnahme freiwillig ist. Es ist mir ebenfalls bekannt, dass ich mich zurückziehen kann ohne irgendwelche Gründe anzugeben und dies wird keine Konsequenz auf meine Behandlung oder mein Verhältnis zu meinem Arzt haben.

Sollten neue Informationen zu diesen Behandlungen verfügbar werden, werden mir diese unverzüglich mitgeteilt.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Studienleiter

## **Information und Einwilligungserklärung zum Datenschutz**

Bei wissenschaftlichen Studien werden persönliche Daten und medizinische Befunde über Sie erhoben. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor Teilnahme an der Studie folgende freiwillige Einwilligung voraus:

1) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten/ Krankheitsdaten auf Fragebögen und elektronischen Datenträgern in der HNO-Klinik der Universität Düsseldorf, aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert weitergegeben werden an:

a) die zuständige Überwachungsbehörde (Landesamt oder Bezirksregierung) oder Bundesoberbehörde (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn) zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie.

2) Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass ein autorisierter zur Verschwiegenheit verpflichteter Beauftragter des Auftraggebers, der zuständigen Überwachungsbehörde oder der zuständigen Bundesoberbehörde in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten Einsicht nimmt, soweit dies für die Überprüfung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden.

4) Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Name, Datum, Unterschrift

**Einwilligungserklärung**  
**zur wissenschaftlichen Verwendung von Blut- bzw. Gewebeproben**  
**und personenbezogenen Daten**

**Sehr geehrte Frau** \_\_\_\_\_ / **Sehr geehrter Herr** \_\_\_\_\_,  
hiermit bitten wir Sie um Ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung Ihrer Blut- bzw. Gewebeproben und Ihrer personenbezogenen Daten, wie Sie Ihnen in der Probandeninformation näher erläutert worden ist.

**Mechanismen der allergischen Rhinitis. Studie zur Untersuchung der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis während der Allergensaison und nach nasaler Allergenprovokation**  
**HNO-Klinik Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf**  
**Ansprechpartner: PD Dr. med. Martin Wagenmann**

**A. Allgemeines**

Ich bin durch den Prüfarzt über den Zweck, den Ablauf, die Bedeutung der klinischen Studie sowie die Vorteile und Risiken, die damit verbunden sein können, mündlich aufgeklärt worden.

Die schriftliche Probandeninformation habe ich gelesen. Alle meine Fragen sind zu meiner Zufriedenheit beantwortet worden.

Ich habe eine Kopie der Probandeninformation und Einverständniserklärung ausgehändigt bekommen. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Studienteilnahme zu überdenken und frei zu treffen.

Meine folgenden Erklärungen reichen nur so weit, wie mir dies im Rahmen der schriftlichen Probandeninformation bzw. in der mündlichen Erläuterung näher dargelegt wurde.

Meine folgenden Erklärungen berechtigen und verpflichten die oben einleitend genannte Institution.

**B. Einwilligung in die Entnahme und Nutzung der Blut- bzw. Gewebeproben**  
*(Zutreffendes bitte ankreuzen)*

Ich bin mit der **Entnahme** einer Blut- bzw. Gewebeprobe einverstanden und überlasse die mir entnommene Blut- bzw. Gewebeprobe hiermit den oben genannten Institutionen.

Ich **stimme zu**, dass die Blut bzw. Gewebeprobe unter der Verantwortung der oben genannten Institutionen in verschlüsselter Form (d.h. so, dass eine Zuordnung zu meiner Person nur über weitere Hilfsmittel – etwa eine Referenzliste – möglich ist).

- für Studien mit allen wissenschaftlich in Betracht kommenden Fragestellungen verwendet wird.
- oder
- für Studien mit der oben genannten Fragestellung verwendet wird.

o Ich bin damit einverstanden, dass ich ggf. (soweit möglich) von den einleitend genannten Institutionen kontaktiert werde, um meine Zustimmung zur Verwendung meiner Blut- bzw. Gewebeprobe in weiteren Studien zu erlauben.

oder

o Ich verlange bereits heute, dass meine Blut- bzw. Gewebeprobe nach Abschluss der genannten Studien vernichtet wird.

o Sofern durch die oben bezeichnete Studie Ergebnisse erzielt werden, die für mich oder meine nächsten Angehörigen von unmittelbarer Bedeutung sind, möchte ich darüber informiert werden.

oder

o Ich bin damit einverstanden, dass ich keine individuellen Rückinformationen über die Ergebnisse der Studie erhalte.

Ich bin mir bewusst, dass ich für die Überlassung meiner Blut- bzw. Gewebeprobe kein Entgelt erhalte.

Ich bin mir bewusst, keinerlei Ansprüche auf Vergütung, Tantieme oder sonstige Beteiligung an finanziellen Vorteilen und Gewinnen zu haben, die möglicherweise auf der Basis der Forschung mit meiner Blut- bzw. Gewebeprobe erlangt werden.

#### **Widerruf der Zustimmung zur Probenverwendung**

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung zur Verwendung meiner Blut- bzw. Gewebeprobe jederzeit und ohne Angaben von Gründen gegenüber der oben genannten Institution/ Personen widerrufen kann und dass dies keinen Einfluss auf meine etwaige weitere ärztliche Behandlung hat.

Im Falle des Widerrufs bin ich damit einverstanden, dass meine Blut- bzw. Gewebeprobe zu Kontrollzwecken weiter aufbewahrt wird. Ich habe jedoch das Recht, deren Vernichtung zu verlangen, sofern gesetzliche Bestimmungen der Vernichtung nicht entgegenstehen.

Ich bin mir bewusst, dass eine Vernichtung der Blut- bzw. Gewebeprobe auf meinen Wunsch nicht möglich ist, wenn sie so weit verschlüsselt („pseudonymisiert“) wurde, dass eine Verbindung zwischen den Proben und meiner Person nicht oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft möglich ist.

**C. Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung (Zutreffendes bitte ankreuzen)**

Ich bin damit einverstanden, dass die einleitend genannten Personen bzw. ein Mitarbeiter der einleitend genannten Institutionen Einblick in meine Original-Krankenunterlagen nimmt.

Ich stimme zu, dass Daten, die meine Person betreffen (hierzu gehören insbesondere auch Krankheitsdaten aus meinen Krankenunterlagen) unter der Verantwortung der oben genannten Institutionen in verschlüsselter Form

für Studien mit wissenschaftlich in Betracht kommenden Fragestellungen gespeichert und verarbeitet werden.

oder

für Studien mit der oben genannten Fragestellung gespeichert und verarbeitet werden.

Ich bin damit einverstanden, dass wissenschaftliche Mitarbeiter und Doktoranden der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie der Studienleiter PD Dr. Martin Wagenmann Einblick in meine Original-Krankenunterlagen nehmen.

Ich bin mir bewusst, dass die zuständigen Behörden im Rahmen ihrer gesetzlichen Befugnisse ggf. Einblick in sämtliche Unterlagen nehmen können.

**Widerruf der Zustimmung zur Datenverwendung**

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung zur Verwendung meiner Daten jederzeit und ohne Angaben von Gründen gegenüber der einleitend genannten Institution bzw. Person widerrufen kann und dass dies keinen Einfluss auf meine etwaige weitere ärztliche Behandlung hat.

Im Falle des Widerrufs bin ich damit einverstanden, dass meine Daten zu Kontrollzwecken weiterhin gespeichert bleiben. Ich habe jedoch das Recht, deren Löschung zu verlangen, sofern gesetzliche Bestimmungen der Löschung nicht entgegenstehen.

Ich bin mir bewusst, dass im Falle einer pseudonymisierten Speicherung meiner Daten deren Löschung auf meinen Wunsch nicht möglich ist.

Datum

Name der Probandin/ des Probanden

Unterschrift

## Hals-Nasen-Ohrenklinik

### Patienteninformation

Mechanismen der allergischen Rhinitis. Studie zur Untersuchung der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis während der Allergensaison und nach nasaler Allergenprovokation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie werden gebeten an einer Untersuchung teilzunehmen, bei der wir die pathophysiologischen Mechanismen bei der allergischen Rhinitis ("Heuschnupfen") in Ihrer Nase untersuchen möchten.

Ehe Sie Ihr Einverständnis geben, lesen Sie bitte dieses Schreiben durch und lassen sich von Ihren betreuenden Ärzten eingehend aufklären, falls Sie etwas nicht verstehen.

Allergische Rhinitis ist eine Erkrankung, deren Häufigkeit in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat. Sie wird bei Menschen mit einer Sensibilisierung durch an sich eigentlich nicht krankmachende Allergene ausgelöst und führt zu den typischen Symptomen wie Augen- und Nasenjucken, Niesen und übermäßiger Sekretproduktion. Des Weiteren führt eine allergische Rhinitis häufig zu einem sogenannten Etagenwechsel in den Atemwegen, es kann ein Asthma bronchiale entstehen. Die Wahrscheinlichkeit, weitere Allergien zu entwickeln, wenn man bereits gegen ein Allergen sensibilisiert ist, ist deutlich erhöht, auch können Kreuzallergien und Nahrungsmittelallergien auftreten.

#### **Ziel der Untersuchung:**

Mit dieser Studie helfen Sie uns, zu verstehen, welche Mechanismen bei der allergischen Rhinitis ablaufen und wie die allergische Entzündungsreaktion gesteuert wird. Hieraus möchten wir anwendungsbezogen die Therapiemöglichkeiten der allergischen Rhinitis verbessern.

#### **Vorgehensweise:**

Die Studie wird durchgeführt gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI). Da es nicht um eine Therapiestudie, sondern um eine diagnostisch-wissenschaftliche Studie handelt, erhalten Sie kein Studienmedikament.

#### **Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien und allgemeine körperliche und HNO-ärztliche Untersuchung (Screening-Visit):**

Vor Aufnahme in die Studie werden Sie gründlich körperlich untersucht, es wird ein HNO-Status mit Allergietest durchgeführt.

Sie erhalten diese Patienteninformation und werden genau über den Ablauf der Studie, die Art der Allergenprovokation, die Probengewinnung und über mögliche Risiken informiert.

Als Schwangere oder Stillende dürfen Sie diese Studie nicht beginnen.

### Visite 1:

Wenn Sie schriftlich Ihr Einverständnis für die Teilnahme an dieser Studie erklärt haben und die körperliche Untersuchung ergibt, dass Sie die Einschlusskriterien erfüllen, führen wir am gleichen Tag, wenn Sie die Methode kennen und damit einverstanden sind, einen Allergietest, eine Blutentnahme und eine Nasenlavage durch. Außerdem erheben wir mit einem Fragebogen Ihre medizinische Vorgeschichte und fragen Ihre Beschwerden ab. Alternativ erhalten Sie hierfür einen neuen Termin.

### Visite 2:

Außerhalb der Allergensaison -also wahrscheinlich im Herbst oder Winter - erhalten Sie einen Termin zur nasalen Allergenprovokation: Dazu werden wir eine Lösung aus Allergenen -das sind natürlich vorkommende Substanzen (z.B. aus Gräserpollen gewonnen), die die allergische Reaktion Ihrer Nase auslösen- auf die Nasenschleimhaut auftragen. Dies geschieht entweder mit einem Spray oder einer kleinen Filterpapierscheibe. Kurz nach dem Auftragen werden die Ihnen bekannten Symptome der allergischen Rhinitis auftreten: Sie werden niesen, Ihre Nase wird laufen und die Nasenatmung erschwert sein. Außerdem kann es zu Jucken in den Augen, zu Tränenfluss und zu einem Jucken im Rachenbereich kommen. Diese Beschwerden können einige Stunden anhalten.

Nach der Provokation werden wir Ihr Nasensekret sammeln und zwar entweder mit Hilfe von Lavagen (das sind Spülungen mit einer physiologischen Kochsalzlösung) oder durch das Auflegen von kleinen Filterpapierscheibchen (Discs) auf die Nasenschleimhaut. In diesem Sekret möchten wir verschiedene Substanzen, die als Antwort auf die Allergenprovokation in Ihrer Nase produziert werden, messen. Außerdem wird mittels einer Kürette eine nicht traumatische Kürettage –ähnlich einem Abstrich- der Nasenschleimhaut vorgenommen.

### Mögliche Risiken und Unannehmlichkeiten:

Die bei durchzuführenden **Blutabnahmen** können schmerzhaft sein und zu einem blauen Fleck an der Entnahmestelle führen.

Die **nasale Allergenprovokation** ist der **Goldstandard** zur Diagnostik einer allergischen Rhinitis. Durch Verabreichung eines Allergenaerosols in die Nase wird künstlich eine rhinitische Reaktion mit Niesen, Tränen, Juckreiz und Sekretfluss ausgelöst. In sehr seltenen Fällen kann es aber auch zu systemischen Reaktionen mit Luftnot, Asthma und sogar bis zum **allergischen Schock** kommen. Solche sehr seltenen, schwerwiegenden Nebenwirkungen bedürfen dann einer intensivmedizinischen Behandlung. Ihr Studienarzt ist mit der Methode der nasalen Allergenprovokation vertraut und kann Notfälle adäquat behandeln. Die nasale Allergenprovokation wird in der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf routinemäßig in der Patientenversorgung eingesetzt. Die folgende Messung des Nasendrucks (anteriore Rhinomanometrie) kann objektivieren, wie stark die allergenabhängige Reaktion der Nasenatmungsbehinderung ist.

Des weiteren messen wir Ihre Symptome: Juckreiz und Niesen. Nach ca. 15 Minuten ist die akute Phase beendet. Ca. 6 Stunden nach nasaler Allergenprovokation kann allerdings wieder eine Nasenatmungsbehinderung, Niesen, Juckreiz oder auch eine systemische Reaktion stattfinden. Ein Notfallset mit Notfallmedikamenten (Desloratadin und Betamethasonsaft) steht Ihnen zur Verfügung, Sie werden im Umgang mit diesen Medikamenten geschult. Bitte bringen Sie am Folgetag (Kontrolltag) die Notfallmedikation wieder mit.

Die Einlage von **Papierdiscs** in die Nase zum Sammeln von Nasensekret nach nasaler Allergenprovokation kann Niesreiz hervorrufen.

**Nasale Kürettagen** erlauben eine oberflächliche Entnahme von Zellen aus dem Gebiet der unteren Muschel mittels eines Abstrichinstrumentes (Kürette) vorzunehmen, ohne dass Sie hierbei „verletzt“

werden. In sehr seltenen Fällen kann es zu vorübergehender Reizung der Schleimhaut, Niesreiz und Augentränen kommen, Blutungen sind sehr selten.

Während der Dauer der klinischen Prüfung sollte eine andere medizinische Behandlung mit Ausnahme von Notfallsituationen nur im Einvernehmen mit dem Prüfarzt erfolgen. **Der klinische Prüfer ist von einer Notfallbehandlung unverzüglich zu unterrichten.** Bei Verdacht auf einen studienbedingten Gesundheitsschaden sind Sie verpflichtet, dies dem klinischen Prüfer unverzüglich anzuzeigen.

Sollten Sie Fragen zu dieser Studie haben, fragen Sie unbedingt Ihren betreuenden Prüfarzt. Er beantwortet Ihre Fragen gern.

**Die Teilnahme ist freiwillig/ alternative Behandlungsmethoden:**

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf hat der Durchführung dieser Studie in vorliegender Form zugestimmt. Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig und so können Sie die Teilnahme auch ablehnen. Sie können auch jederzeit Ihre Teilnahme beenden – ohne Nachteile für Ihre weitere Behandlung. Außerdem ist die Pflicht jedes Studienarztes die Studienbehandlung abzubrechen, falls Risiken für Ihre Gesundheit bestehen.

Sollten Sie Fragen hinsichtlich dieser Studie haben, beobachten Sie Nebenwirkungen oder benötigen Sie medizinische Behandlung, dann wenden Sie sich bitte ohne zu zögern an das Studienteam der HNO-Klinik Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf. Tel. 0211/8117580.

## **Danksagung**

Ich danke besonders meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann, für die freundliche Aufnahme in dessen Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in Klinik und Labor der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Betreuer, Dr. Ralf Baumann, für die stetige Unterstützung bei der Weiterentwicklung des Themas sowie die zahlreichen Ratschläge während dessen Umsetzung.

Beiden danke ich darüber hinaus für die Durchsichten dieser Arbeit und die konstruktiven Anmerkungen.

Frau Prof. Dr. med. Antje Schuster danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

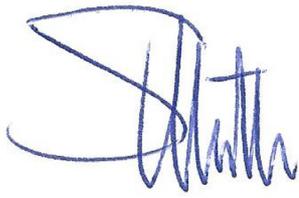
Bei allen Mitarbeitern des HNO-Forschungslabors bedanke ich mich für die gute Atmosphäre und die tatkräftige Unterstützung.

Recht herzlich gedankt sei allen Personen, die ihr Nasensekret, ihr Blut und ihre Zeit für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

13.07.2016, Lisa Schüller

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lisa Schüller', written in a cursive style.

Unterschrift