

**Die Rolle der T-Helferaktivität bei Patienten
mit schwerem allergischem Asthma
unter Omalizumab Therapie
Vergleich von klinischen und ex vivo Daten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Tibor Jakob Schaarschmidt

aus Bonn

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gudrun Ulrich-Merzenich
2. Gutachterin: Prof. Dr. Birgitta Weltermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.03.2026

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1. Einleitung | 8 |
| 1.1 Asthma bronchiale | 8 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 9 |
| 1.2 Aktuelle Leitlinien und Stufenschema | 10 |
| 1.3 Pathophysiologie | 12 |
| 1.3.1 Exogenes allergisches Asthma | 13 |
| 1.3.2 Endogenes Asthma | 14 |
| 1.3.3 Verschiedene Endotypen | 14 |
| 1.4 Immunopathogenese des exogenen allergischen Asthma | 15 |
| 1.4.1 T-Zellen | 16 |
| 1.4.2 TNF- α | 18 |
| 1.4.3 IgE | 19 |
| 1.5 Antikörpertherapien | 22 |
| 1.5.1 Omalizumab | 24 |
| 1.6 Ziel der Arbeit | 25 |
| 2. Material und Methoden | 26 |
| 2.1 Geräte und Materialien | 26 |
| 2.1.1 Geräte | 26 |
| 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchslösungen | 26 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterial | 26 |
| 2.1.4 ELISA-Test-Kits | 26 |
| 2.1.5 MACS Zellseparierung | 26 |
| 2.1.6 RNA Extraktions-Kit | 27 |
| 2.1.7 cDNA-Synthese | 27 |
| 2.2 Rechtliche Grundlage/ Ethikkommission/ Ethikvotum Nummer: 161/15 | 27 |
| 2.3 Rekrutierung der Probanden und der Kontrollgruppe | 27 |
| 2.4 Medikation | 28 |
| 2.5 Verlaufskontrolle der Patienten | 29 |
| 2.5.1 Klinische Untersuchungen | 29 |
| 2.6 Labor | 30 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.6.1 | Zellisolierung | 31 |
| 2.6.2 | Zellstimulation | 32 |
| 2.6.3 | ELISA | 33 |
| 2.6.4 | RNA-Isolierung | 34 |
| 2.6.5 | cDNA-Synthese aus RNA | 34 |
| 2.6.6 | Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (Rt-qPCR) | 35 |
| 3. | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Klinische Untersuchungen | 37 |
| 3.1.1 | FEV1 | 37 |
| 3.1.2 | FeNO | 38 |
| 3.1.3 | ACT (A sthma C ontrol T est) | 39 |
| 3.2 | Zellkultur | 40 |
| 3.2.1 | IL-4 Freisetzung | 40 |
| 3.2.2 | IL-5 Freisetzung | 42 |
| 3.2.3 | IL-13 Freisetzung | 43 |
| 3.2.4 | TNF- α Freisetzung | 44 |
| 4. | Diskussion | 46 |
| 4.1 | Klinische Untersuchungen und Patientenbefragung | 47 |
| 4.1.1 | FEV ₁ | 47 |
| 4.1.2 | FeNO | 48 |
| 4.1.3 | ACT (A sthma C ontrol T est) | 49 |
| 4.2 | Molekularbiologische Untersuchungen | 50 |
| 4.2.1 | IL-4 | 50 |
| 4.2.2 | IL-5 | 51 |
| 4.2.3 | IL-13 | 52 |
| 4.2.4 | TNF- α | 52 |
| 5. | Zusammenfassung | 54 |
| 6. | Abbildungsverzeichnis | 55 |
| 7. | Tabellenverzeichnis | 56 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 57 |
| 9. | Erklärungen zum Eigenanteil | 66 |
| 10. | Veröffentlichungen | 67 |

11. Danksagung

68

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| ACT | A sthma C ontrol T est |
| APC | A ntigen p resenting c ell |
| ÄZQ | Ä rztliches Z entrum für Q ualität in der Medizin |
| BAL | b ronchoalveoläre L avage |
| BMI | B ody- M ass- I ndex |
| BSA | B ovines S erumalbumin |
| CD4+ -Zellen | C luster o f D ifferentiation - 4 positive Zelle |
| cDNA | c omplementary d eoxyribonucleic a cid |
| DNA | D eoxyribonucleic a cid |
| DNase | D esoxyribonuklease |
| EDTA | E thylendiamintetraacetat |
| ELISA | E nzyme-linked I mmunosorbent A ssay |
| FeNO | F raktioniertes e xhalierendes S tickstoffmonoxid |
| FEV ₁ | F orciertes e xpiratorisches V olumen in einer S ekunde |
| GINA | G lobal I nitiative F or A sthma |
| HRP | H orseradish p eroxidase (= M eerrettichperoxidase) |
| ICS | I nhalative C orticosteroide |
| IgD | I mmunglobulin D |
| IgE | I mmunglobulin E |
| IgM | I mmunglobulin M |
| IL-4 | I nterleukin 4 |
| IL-5 | I nterleukin 5 |
| IL-13 | I nterleukin 13 |
| IL-33 | I nterleukin 33 |
| IO | I onomycin |

| | |
|---------------|--|
| LABA | long acting beta 2 receptor agonists |
| LAMA | long acting muscarin antagonists |
| LTRA | Leukotrienrezeptorantagonisten |
| MACS | magnetic cell separation |
| NVL | Nationale Versorgungsleitlinien |
| OMA | Omalizumab |
| OCS | orales Cortikosteroid |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| qPCR | quantitative Polymerase Chain Reaction |
| RNA | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RT | Reverse Transkription |
| RT-PCR | Real-Time Polymerase Chain Reaction |
| SABA | short acting beta 2 receptor agonists |
| TACE | TNF- α Converting Enzyme |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TSLP | thymic stromal lymphopoietin |
| Tween 20 | Polysorbat 20 (Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat) |

1. Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Der Begriff „Asthma“ hat seinen Ursprung im altgriechischen („ $\alpha\sigma\theta\mu\alpha$ “) und kann mit Atemnot, Stöhnen, lautem Atmen übersetzt werden. Homer verwendete den Ausdruck erstmals nachweislich in seiner „Ilias“ für die Beschreibung des Ringens nach Luft von Hector, nach einem schweren Treffer gegen seinen Brustkorb im Kampf gegen Ajax (Saunders, 1993). Im heutigen Sprachgebrauch beschreibt Asthma bzw. Asthma bronchiale eine Erkrankung, die durch eine chronische Entzündung der Atemwege und damit einhergehenden unterschiedlichsten Symptomen charakterisiert ist. Asthma bronchiale zeichnet sich durch das Auftreten verschiedener Leitsymptome, wie Atemnot, Giemen („Wheezing“), Brustenge, Husten mit und ohne Auswurf, sowie durch eine bronchiale Hyperreagibilität aus (GINA, 2020). Die Symptome können zeitlich und in ihrer Intensität stark variieren, anfallsartig auftreten aber unter Umständen auch spontan für Wochen oder Monate ausbleiben. Zudem kann es bei manchen Betroffenen zu einer episodentartig starken Verschlechterung der Symptomatik (Exazerbation) kommen, wobei die Ursachen weiterhin nicht vollständig geklärt sind (Daugherty und Fahy, 2009). Die Atemwegsobstruktion resultiert im Wesentlichen aus der Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchien, der inflammatorisch bedingten Hypertrophie des Atemwegsendothels, Ödemen der Atemwegswände, übermäßige Bronchialsekretproduktion (Hyperkrinie) und nach einem mehrjährigen Krankheitsverlauf möglichen irreversiblen Umbauvorgängen der Bronchien dem sogenannten Remodeling (Elias *et.al.*, 1999). Die individuelle Ausprägung dieser Symptome und die unterschiedlichen Reaktionen auf verschiedene Therapieansätze führten im Laufe der Zeit zu einer komplizierten und nicht immer einheitlichen Unterscheidung verschiedener Astmatypen und Untertypen (1.3 ff.).

Durch die enormen Behandlungskosten, die kostenintensiven neuen Immuntherapien (siehe 1.5) und den Produktivitätsverlust stellt Asthma eine große Belastung für die sozialen Gesundheitssysteme dar (Aumann *et.al.*, 2014). Das Statistische Bundesamt errechnete für das Jahr 2008 Kosten in Höhe von 1,78 Mrd. Euro für das deutsche Gesundheitssystem. Das entspricht einem Anteil von 13,6 % an den gesamten Kosten,

die im Zusammenhang mit den Erkrankungen des Atmungssystems anfallen (Destatis.de, 2010). Dies verdeutlicht, wie wichtig Fortschritte in der Diagnostik und der richtigen Typisierung sind. Denn hier gibt es großes Potential bei der Individualisierung der Therapie. Der aktuelle Erkenntniszuwachs in der klinischen Forschung und auf dem Feld neuer molekularbiologisch basierter Therapieansätze ist dabei sowohl für den einzelnen Patienten als auch für die gesamte Gesellschaft von enormer Bedeutung.

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit leiden mehr als 300 Millionen Menschen an Asthma mit insgesamt steigender Prävalenz (GINA, 2018). In Australien und Nordwesteuropa scheinen die Zahlen für adultes schweres Asthma hingegen zu stagnieren (Lundbäck *et.al.*, 2016). Die Zunahme in Entwicklungsländern mit einer gemeinhin geringeren Prävalenz kann dabei nicht nur mit einer steigenden Urbanisierung und der damit einhergehenden Belastung mit Feinstaub, Abgasen und andere Umweltgiften erklärt werden. Es deutet vielmehr darauf hin, dass eine multifaktorielle Genese für die Entstehung von Asthma ursächlich ist (siehe 1.3) (Beasley *et.al.*, 2000). Zudem zählt Asthma in Westeuropa zu den häufigsten chronischen Kindererkrankungen. 10 % der kindlichen Bevölkerung ist betroffen, wobei das frühkindliche Asthma eine Sonderform darstellt und nicht zwingend eine lebenslange Symptomatik nach sich zieht (Pijnenburg und De Jongste, 2007; Pijnenburg, 2019). Für Deutschland gibt das RKI bei adultem Asthma bronchiale eine 12 - Monatsprävalenz von 6,2 % an. Frauen waren dabei häufiger betroffen als Männer (7,1 % vs. 5,4 %) (Stepphuhn *et.al.*, 2017).

Allerdings muss bei epidemiologischer Betrachtung von Asthma auch auf spezifische Schwierigkeiten bei der Datenlage hingewiesen werden. So gibt es keine weltweit gültige Definition für Asthma und die Heterogenität der Symptome erschwert zusätzlich eine klare Diagnose. Es gibt keinen Gold-Standard-Test in der Diagnostik und ein breites Spektrum an Differentialdiagnosen (Sears, 2014). Des Weiteren wird eine mögliche Überdiagnostik von Asthma in Industrienationen diskutiert. In einer Studie aus Kanada mit 496 zuvor diagnostizierten Asthmapatienten wurden nach erneuter eingehender Diagnostik über einen längeren Zeitraum rund 30% der Patienten nicht mehr als Asthmatiker eingeordnet

(Aaron *et. al.*, 2008). Die Auswertung aktueller Daten einer Studie aus Deutschland ergab, dass im Jahr 2019 etwa 54.000 Patienten in Deutschland, die gemäß dem Programm der nationalen Versorgungsleitlinien (NVL) in der Stufe 4/5 behandelt wurden, unter einer schlechten Asthmakontrolle leiden. Zudem wurden insgesamt jedoch nur 12.000 Patienten mit Biologicals behandelt, was auf eine mögliche Behandlungslücke in diesem Bereich hindeutet (Bergmann *et. al.*, 2022).

1.2 Aktuelle Leitlinien und Stufenschema

Das Programm für Nationale Versorgungsleitlinien (NVL) ist eine gemeinsame Initiative von Bundesärztekammer, Kassenärztlicher Bundesvereinigung und Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften zur Qualitätsförderung in der Medizin. Die operative Durchführung und Koordination des NVL-Programms erfolgt durch das ärztliche Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ) (Leitlinien.de, 2022). In der aktuellen 4. Auflage der NVL von 2020 wird neben einer Definition und epidemiologischer Einordnung des Asthma bronchiale auf Diagnostik und Monitoring, Therapieplanung und gemeinsame Entscheidungsfindung (mit dem Patienten) sowie medikamentöse und nicht medikamentöse Therapiemöglichkeiten eingegangen.

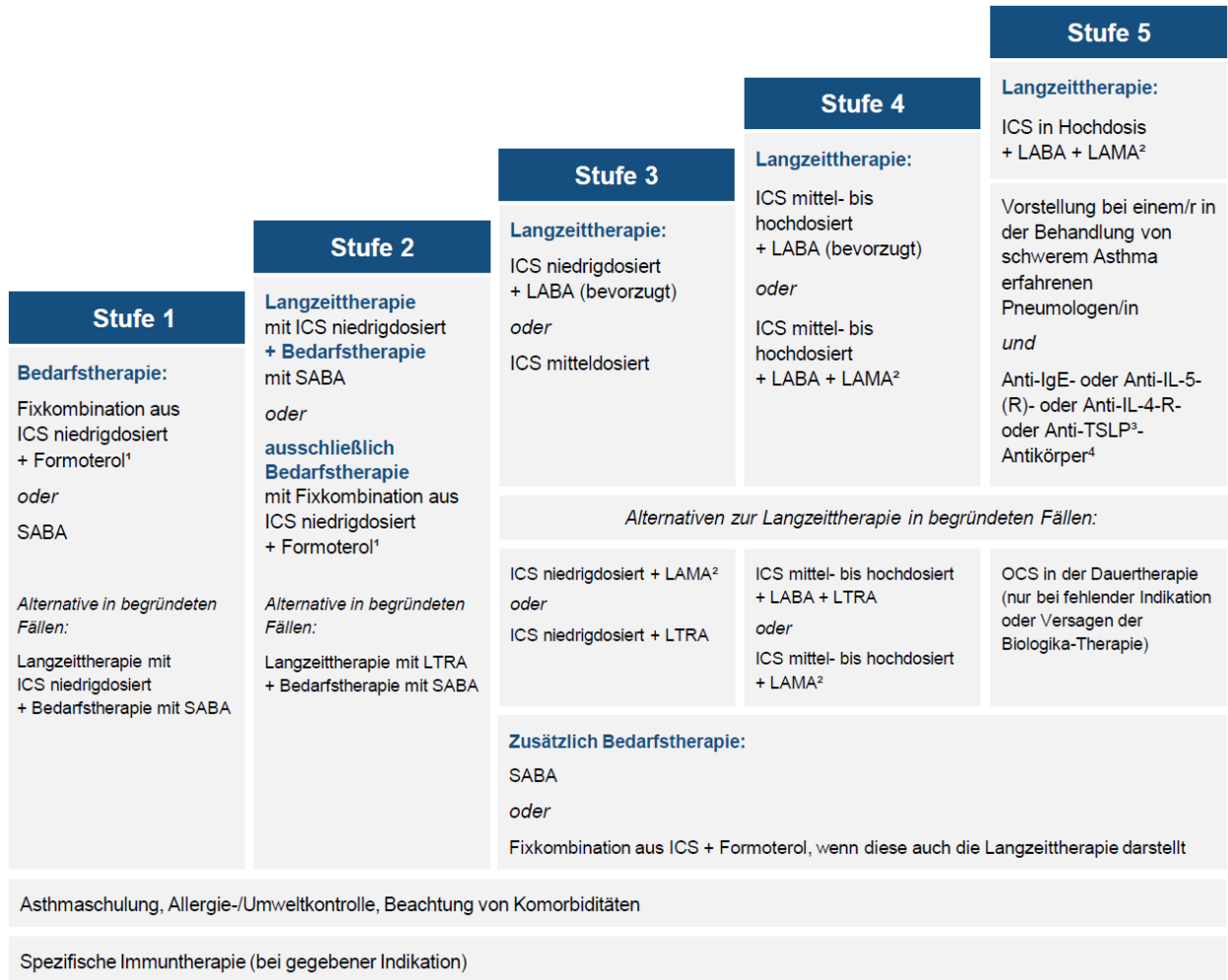
Teil dieser Leitlinie ist das medikamentöse Stufenschema (Abb. 1). Patienten mit einem diagnostizierten Asthma bronchiale sollen gemäß diesen Schemas behandelt werden. Die Basis der Behandlung bilden inhalative Corticosteroide (ICS), die stark entzündungshemmend wirken und der Krankheit zugrundeliegende entzündliche Reaktionen behandeln. Begonnen wird mit einer Bedarfstherapie und niedrig dosierten ICS. Bei keiner deutlichen Verbesserung oder sogar einer Verschlechterung der Symptomatik über die Zeit kann die Dosierung der ICS erhöht werden (bis hin zur pharmakologisch gebotenen Höchstdosis in Stufe 5). Zusätzlich zu einer Erhöhung der ICS Dosis werden auf den unteren Stufen bedarfsgerecht kurzwirksame β 2-Sympathomimetika (short-acting beta 2-agonists/ SABA) auf höheren Stufen langwirksame β 2-Sympathomimetika (long-acting beta2-agonists/ LABA) und langwirksame Muskarinantagonisten (long-acting muscarin antagonists/ LAMA) eingesetzt, welche bronchodilatatorisch und bronchospasmolytisch wirken und auf diese

Weise die Atmung erleichtern sollen. Auf Stufe 5 des Stufenschemas wird unter folgenden Zusatzvoraussetzungen (s.u.) die Behandlung mit IgE-, IL4- oder IL5- Antikörpern empfohlen:

- schweres IgE-vermitteltes allergisches Asthma
- positiver Hauttest oder in-vitro Reaktivität gegen ein ganzjährig auftretendes Aeroallergen
- IgE-Serumkonzentration unter Berücksichtigung des Körpergewichts im therapierbaren Bereich
- erfolgte Eliminierung vermeidbarer Allergenexpositionen.

Die Behandlung mit Antikörpern, die zu den Biologicals (siehe 1.5) gezählt werden, hat in den letzten Jahrzehnten zu immensen Erfolgen bei der Behandlung unterschiedlichster Krankheitsbilder geführt (Singh *et.al.* 2018). 2005 hat Novartis mit Omalizumab (Handelsname Xolair®) einen IgE Anti-Antikörper auf den Markt gebracht, der möglicherweise nicht nur eine Option auf der letzten Stufe des Behandlungsschemas darstellt, sondern eine wirkungsvolle Alternative oder Ergänzung zu der etablierten, aber doch nebenwirkungsreichen, Kortison-Stufentherapie darstellen könnte (Humbert *et.al.*,2014).

Die Wünsche und Bedürfnisse des Patienten in Verbindung mit seiner Partizipation am gesamten Therapiemanagement, sind der Schlüssel für eine erfolgreiche Behandlung und mindestens genauso wichtig wie die richtige Auswahl der medikamentösen Therapie (GINA, 2020).



¹ Fixkombination (ICS niedrigdosiert + Formoterol) bedarfsorientiert in Stufe 1 und 2 nicht zugelassen. (Stand: August 2020)

² aus der Gruppe der LAMA ist Tiotropium für die Behandlung des Asthmas zugelassen (Stand: August 2020)

ICS: Inhalative Corticosteroide, IgE: Immunglobulin E, IL: Interleukin, LABA: Langwirkende Beta-2-Sympathomimetika, LAMA: Langwirkende Anticholinergika, LTRA: Leukotrienrezeptorantagonisten, OCS: Orale Corticosteroide, R: Rezeptor, SABA: Kurzwirkende Beta-2-Sympathomimetika

Abb. 1: Asthma-Stufenschema für die Langzeittherapie bei Asthma bronchiale aus den neuen Asthma-Leitlinien von 2024 (AWMF online, 2024).

1.3 Pathophysiologie

Grundsätzlich kann zwischen exogenen (allergischen) und endogenen (nicht-allergischen) Asthmatypen unterschieden werden. Die Unterscheidung bezieht sich dabei auf die unterschiedlichen Ursachen, den Triggern für eine Asthma Symptomatik. Die Grenzen bei dieser Unterscheidung sind jedoch oft fließend und viele Patienten leiden unter einer Mischform (Mutschler *et. al.*, 2008). Der GINA-Report von 2020 erwähnt noch weitere Sonderformen wie das „Adult-onset“ oder das „Asthma with persistent airflow“,

welches auf ein Remodeling der Atemwege nach vorangegangener langer schwerer Asthma Symptomatik zurückzuführen ist (GINA-Report 2020). Ob genetische Ursachen oder exogene Faktoren bestimmend bei der Entwicklung von Asthma sind, ist nicht abschließend geklärt (Scherzer und Grayson, 2018). Eine Reihe genetischer Marker, die sowohl die Entstehung als auch die Schwere des Asthmas beeinflussen können, wurden identifiziert. Keines dieser Gene konnte aber als alleiniger Verursacher von Asthma identifiziert werden. Einige bestimmte Genvarianten konnten aber mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung assoziiert werden (Berenguer *et.al.*, 2014). Zudem wird ein möglicher Einfluss des Mikrobioms auf epigenetischer Basis diskutiert. So wurde in Mausstudien gezeigt, dass eine ballaststoffreiche Ernährung zu einem veränderten Mikrobiom führte, welches wiederum durch seine Ausscheidungen zu einer veränderten Genexpression (Acetylierung einer Promotorregion für FoxP3) in schwangeren Mäusen führte, deren Nachkommen deutlich weniger allergische Atemwegserkrankungen aufwiesen (Thorburn *et.al.*, 2015).

1.3.1 Exogenes allergisches Asthma

Allergisches Asthma ist die häufigste Form des Asthmas und betrifft einen Großteil der Patienten (Schatz und Rosenwasser 2014; Romenet-Manent *et.al.*, 2002). Bei diesen sogenannten Atopikern kommt es aufgrund einer genetischen Prädisposition zu einer IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber eigentlich harmlosen Allergenen. Die Natur dieser Allergene scheint keine Rolle zu spielen und umfasst Proteine, Kohlenhydrate oder andere niedermolekulare Stoffe verschiedenster Herkunft (z.B. Tiere, Pflanzen, Pilze, Hausstaub) (Galli und Tsai, 2012). Durch eine Verkettung verschiedener immunologischer Prozesse (s.u.) kommt es zu einer Überproduktion von IgE und einer vermehrten Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten. Durch einen starken Anstieg der Freisetzung und Synthese weiterer Mediatoren und Botenstoffen kommt es zu den für einen Asthmaanfall typischen Symptomen wie z. B. Bronchokonstriktion, Hyperkrinie, Mukosaödemen oder Pulsus Paradoxus (Vetrano und Wanka, 2017). Nach vielen Jahren und mit zunehmender Schwere der Symptomatik können neben den eigentlichen Allergenen auch unspezifische Reize als Trigger fungieren (Mutschler *et.al.*, 2008).

1.3.2 Endogenes Asthma

Im Gegensatz zu einem exogenen allergischen Asthma wird das endogene Asthma nicht durch spezifische Allergene aus der Umwelt ausgelöst, sondern durch andere Reize verursacht. Sowohl Tabakrauch, eine hohe Feinstaubbelastung, starke körperliche Anstrengung, kalte Luft oder eine Infektion der Atemwege können Auslöser sein. Es wird jedoch angenommen, dass diese Faktoren nicht ursächlich für die Erkrankung sind. Vielmehr ist eine bereits vorhandene Hyperreagibilität des Bronchialsystems die Grundvoraussetzung für ein endogenes Asthma (Reuter, 2004; Mutschler *et.al.*, 2008).

Eine Sonderform des endogenen Asthmas ist das Analgetikaasthma, bei dem starke Exazerbationen direkt durch die Einnahme von Arzneimitteln wie ASS (Acetylsalicylsäure) oder NSAR (nicht steroidale Antirheumatika) hervorgerufen werden (Babu und Salvi, 2000). Grundlage ist die gemeinsame Fähigkeit der Medikamente, das Enzym Cyclooxygenase-1 zu hemmen, wodurch die Aktivität der Leukotrien-C4-Synthase zunimmt und letztendlich ein Prostaglandinmangel entsteht, der bei sensitiven Asthma-Patienten eine lebensbedrohliche Bronchokonstriktion auslösen kann (Szczeklik und Stevenson 2003). Mit Absetzen der Medikamente verbessert sich die Symptomatik schnell und deutlich.

1.3.3 Verschiedene Endotypen

Ein Endotyp beschreibt einen Subtyp einer Krankheit, der funktionell und pathologisch durch einen molekularen Mechanismus oder durch die von anderen Endotypen abweichende Reaktion auf eine Therapie definiert wird (Charriot *et.al.*, 2016; Heaney *et.al.*, 2021). Wie in 1.3 ff. ausgeführt wird, ist Asthma eine sehr heterogene Krankheit. Oft können verschiedene Ausprägungen und Ursachen nicht scharf voneinander abgegrenzt werden (Anderson, 2008). Eine häufig getroffene Unterscheidung bei schwerem allergischem Asthma ist die Endotypisierung in „Th₂-low“ und „Th₂-high“, je nachdem, ob die entzündlichen Reaktionen durch eine humorale Th₂ vermittelte Immunantwort bestimmt werden oder nicht. Folgend auf diese Kategorisierung kann bei den „Th₂-high“ Endotypen zusätzlich zwischen atopischen (IgE-vermittelt), eosinophilen

und nicht-eosinophilen Gruppen unterschieden werden (Charriot *et.al.*, 2016; Heaney *et.al.*, 2021). Die genauere physiologische Charakterisierung bekannter Endotypen und die Identifizierung weiterer Endotypen erfordert dabei einen integrierten Ansatz, der klinische Merkmale, genetische und molekularbiologische Ansätze miteinander verknüpft (Wenzel, 2012).

1.4 Immunopathogenese des exogenen allergischen Asthma

Die immunologischen Abläufe, die an den Entzündungsreaktionen des Asthma bronchiale beteiligt sind, können zu Recht als komplex bezeichnet werden. Eine Vielzahl an Zellen und verschiedenste Botenstoffe der zellulären und humoralen Immunantwort sind daran beteiligt (Simon und Blaser, 1999; Lloyd und Hessel, 2010). Je nachdem, um welchen Phänotypen es sich handelt (siehe 1.3.1-1.3.3), werden unterschiedliche Zelltypen des Immunsystems mit ihren spezifischen Reaktionskaskaden angesprochen und reagieren, unter Umständen abhängig von der Endotypisierung, auch auf unterschiedliche Weise (Heaney *et.al.*, 2021). Da sich die vorliegende Arbeit mit einer Patientengruppe beschäftigt, deren Krankheitsbild dem schweren exogenen allergischen Asthma zugeschrieben wird, beschränken sich die folgenden Ausführungen auf selbiges.

Die Immunopathogenese des allergischen Asthma bronchiale ist durch eine Th₂ vermittelte Immunantwort in Zusammenhang mit einer allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ1) charakterisiert (Robinson *et.al.*, 1992; Simon und Blaser, 1999). Die zugrundeliegende allergische Reaktion vom Soforttyp verläuft dabei nach einem gut untersuchten Muster ab. In der sogenannten Sensibilisierungsphase kommt es zu einem Erstkontakt mit einem Allergen, meist auf den Schleimhäuten der oberen Atemwege (z. B.: Hausstaub, Gräserpollen, Tierhaare, etc...). Selbst sehr geringe Mengen eines Allergens reichen dabei aus, um die immunologische Kaskade zu initiieren. Diese beginnt damit, dass für das Allergen spezifische T-Helferzellen vom Typ 2 (Th₂) gebildet werden. Die Th₂-Zellen werden aktiviert und binden an B-Zellen, die sich zu Antikörper produzierenden Plasmazellen umwandeln und als B-Gedächtniszellen im Körper verbleiben, um so eine rasche und effektive Immunantwort bei erneuten Allergenkontakt zu ermöglichen. Die von den Plasmazellen produzierten allergenspezifischen IgE

Antikörper binden an die Oberfläche von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und schließen somit die Sensibilisierungsphase ab (Gould und Sutton, 2008). Diese Art der Erstsensibilisierung verläuft ohne die typischen Symptome einer allergischen Reaktion und wird von den Patienten meist nicht wahrgenommen (Schütt und Bröker, 2009).

Bei einem Zweitkontakt mit dem nun „bekannten“ Allergen kommt es durch die Kreuzvernetzung (cross-linking) benachbarter IgE Antikörper auf der Oberfläche der Mastzellen zu einer Mastzelldegranulation und damit zu einer massiven Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin, Prostaglandinen und verschiedenen Leukotrienen (Casale *et.al.*, 1987). Vor allem Histamin und Leukotriene bewirken anschließend eine periphere Vasodilatation und eine Bronchokonstriktion, die zu den klassischen Symptomen einer allergischen Reaktion, wie Hautrötung und Atemnot, führen.

1.4.1 T-Zellen

T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, gehören zu den Leukozyten und stellen zusammen mit den B-Zellen einen wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunantwort dar. Wie alle Blutzellen haben die T-Zellen ihren Ursprung im Knochenmark, migrieren aber früh in den Thymus (daher der Name T-Zelle) um dort immunologisch zu reifen und zu verschiedenen Klassen von T-Zellen auszudifferenzieren. Die beiden größten T-Zellpopulationen bilden dabei die T-Helferzellen (Th), die durch das Vorhandensein von CD4 Oberflächenrezeptoren gekennzeichnet sind und die zytotoxischen T-Zellen (CTL), welche CD8 Oberflächenrezeptoren exprimieren (Schütt und Bröker, 2009). Zytotoxische T-Zellen sind darauf spezialisiert, infizierte oder anderweitig krankhafte Zellen ausfindig zu machen, und durch die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen deren Apoptose einzuleiten. Die CD4 positiven T-Helferzellen lassen sich wiederum in zwei Subpopulationen unterteilen; Th₁ und Th₂-Zellen. Th₁ –Zellen sind Bestandteil der zellulären Immunantwort und spielen eine Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen. Die Th₂-Zellen hingegen tragen zu einer Regulierung der Immunantwort bei und sind zentraler Bestandteil der humoralen Immunantwort. Sie treten mit Hilfe des T-

Zell-Rezeptors mit antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie z.B. dendritische Zellen, in Kontakt. Die Th-Zellen reagieren auf die präsentierten Antigene und „entscheiden“, ob eine Immunantwort notwendig ist. Fällt die Entscheidung positiv aus, können sie verschiedene Zytokine sezernieren, die z.B. andere Th-Zellen rekrutieren und so eine Immunantwort verstärken. Zudem können sie B-Zellen aktivieren und so zu einer gezielten Antikörperproduktion anregen (siehe 1.4) (Lloyd und Hessel, 2010).

1.4.1.1 Th₂-CD4⁺-Zellen und assoziierte Zytokine, IL-4, IL-5, IL-13

Th₂-Lymphozyten sind Teil der humoralen Immunantwort und spielen vor allem bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene, wie Bakterien und Parasiten eine wichtige Rolle. Th₂-Zellen sind aber auch bei der Entstehung und dem Verlauf des allergischen Asthmas von zentraler Bedeutung (siehe 1.4) (Hansen, 2001). Bei atopischen Patienten konnte sowohl in Lungenbiopsien als auch in einer bronchoalveolären Lavage (BAL) eine stark erhöhte Anzahl an Th₂-Lymphozyten festgestellt werden (Robinson *et.al.*, 1992). Charakteristisch für diese T-Helferzellen Subpopulation ist die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Zudem können Th₂-Zellen auch noch IL-9, IL-10, IL-21 und IL-25 produzieren. Bei einer Aktivierung durch APCs wird vor allem Interleukin 4 ausgeschüttet. Sobald eine gewisse Schwellenkonzentration an IL-4 erreicht ist, wird die Differenzierung weitere T-Helferzellen zu Th₂-Zellen gefördert (Rekrutierung), zudem wird die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen induziert (Chatila, 2004). Zusätzlich wird über IL-4 ein Antikörper Klassenwechsel bei Plasmazellen induziert. Die zunächst IgM produzierenden Plasmazellen wechseln zu einer Produktion von IgE Antikörpern, die nun die oben beschriebene allergische Sofortreaktion (siehe 1.4) durch eine Mastzelldegranulation fördern. Gerät dieser Prozess außer Kontrolle, kann ohne therapeutische Intervention ein anaphylaktischer Schock daraus resultieren. Zusammen mit IL-9 fördert IL-4 das Wachstum von Mastzellen und ist indirekt auch an der Migration von eosinophilen Granulozyten in das Gewebe beteiligt. Außerdem unterdrückt IL-4 die Differenzierung von T-Lymphozyten zu Th₁-Zellen (Hansen, 2001). IL-5 reguliert unter anderem die Rekrutierung, Aktivierung und Lebensdauer der eosinophilen Granulozyten, welche durch die Ausschüttung verschiedener Entzündungsmediatoren das Bronchialepithel angreifen, was zu einer Vasodilatation, Kontraktion der glatten

Bronchialepithelmuskulatur und einer erhöhten Schleimproduktion führt (Lopez *et.al.*, 1986; Farne *et.al.*, 2017). Schon früh konnte in Bronchialbiopsien von Asthmapatienten eine erhöhte Menge an IL-5 mRNA (und IL-4 mRNA) festgestellt werden, welche mit der Schwere der Krankheitssymptome korrelierte (Humbert *et.al.*, 1997). IL-13 ist mitverantwortlich für die Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität, der Hyperkrinie, ist am Remodeling der Atemwege beteiligt und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Schlüsselsymptome des allergischen Asthmas (Mattes *et.al.*, 2001; Kinyanjui *et.al.*, 2013; Chatila, 2004). IL-13 ist unter anderem ebenfalls an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt und induziert den Immunglobulin Klassenwechsel von IgD zu IgE und IgG 4 (Punnonen *et.al.*, 1993).

1.4.2 TNF- α

TNF- α ist ein breit wirkendes Zytokin und spielt eine Rolle bei lokalen als auch systemischen Entzündungsreaktionen. TNF- α liegt primär als 26 kDA schweres Transmembranprotein vor. Die Aktivierung erfolgt durch eine enzymatische Spaltung mit Hilfe einer Metalloprotease (TACE = TNF- α Converting Enzyme). Anschließend formt TNF- α biologisch aktive Homotrimere von 51 kDA (Smith und Baglioni, 1987). Es wird hauptsächlich von Makrophagen gebildet, kann aber auch durch Lymphozyten, Mastzellen und sogar Endothelzellen sezerniert werden. TNF- α hat viele immunregulatorische Aufgaben und kann die Zelldifferenzierung, Proliferation und Ausschüttung anderer Zytokine beeinflussen, zudem ist es an der direkten rezeptorvermittelten Auslösung der Apoptose beteiligt. Damit spielt dieses Zytokin eine wichtige Rolle in immunologischen Reaktionen aber auch z.B. bei der Organogenese (Helgans und Pfeffer, 2005). TNF- α ist direkt an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt und fördert die Ausschüttung T-Zell-assoziiertes Zytokine (Scheurich *et.al.*, 1987). Schon früh wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass TNF- α auch bei asthmatischen Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen kann. Ying *et.al.* konnten 1991 eine erhöhte Konzentration von mRNA (TNF- α mRNA) und TNF- α selbst in bronchoalveolären Lavagen (BAL) von 10 atopischen Asthmatikern nachweisen (Ying *et.al.*, 1991). TNF- α induziert direkt die Histaminfreisetzung durch Mastzellen (Overveld *et.al.*, 1991). Durch eine positive autokrine Regulation (sich selbst verstärkend) von TNF- α kann es zu einer

starken Zytokinfreisetzung von Mastzellen im Lungengewebe kommen und damit eine Hyperreagibilität begünstigen (Coward *et.al.*, 2002). TNF- α ist auch an der Rekrutierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten via Chemotaxis beteiligt (Lukacs *et.al.*, 1995). Zusätzlich dazu erhöht TNF- α die zytotoxischen Eigenschaften von eosinophilen Granulozyten auf Endothelzellen (Slungaard *et.al.*, 1990). Alle der oben beschriebenen Eigenschaften spielen bei schwerem Asthma bronchiale eine Rolle. Trotzdem ist es fraglich, ob eine Immuntherapie die sich direkt gegen TNF- α richtet, erfolgsversprechend ist. Die Studienlage dazu ist nicht eindeutig und es gibt Hinweise auf schwere Nebenwirkungen. Möglicherweise kann nur eine kleine Gruppe bestimmter Endotypen von einer Anti-TNF- α Therapie profitieren (Berry *et.al.*, 2007)

1.4.3 IgE

Immunglobulin E wurde als letztes der fünf humanen Immunglobuline entdeckt und entsprechend der Nomenklatur für humane Immunglobuline benannt. „E“ steht dabei für den fünften Buchstaben im Alphabet (Bennich und Ishizaka, 1986). Der Aufbau als Monomer aus 2 schweren und 2 leichten Ketten mit typischer „Y“ Form entspricht dem von IgD und IgG, wobei die schweren Ketten aus einer Domäne mehr bestehen. Sowohl die native als auch die rezeptorgebundene Form von IgE liegen in einer geknickten Form vor (Abb. 2), sind aber trotzdem flexibel und gewährleisten eine Quervernetzung (Zheng und Shopes, 1991). Im Vergleich zu allen anderen Immunglobulinen im menschlichen Körper hat IgE mehrere Alleinstellungsmerkmale. So liegt IgE, wenn keine allergische Reaktionskaskade in Gange ist, hauptsächlich zellgebunden vor und stellt mit unter 1 % den geringsten Anteil aller humanen Antikörper (Janeway *et.al.*, 5. Edition 2001; Gould und Sutton, 2008). IgE wird hauptsächlich über den hochaffinen Fc ϵ RI und CD23 auf der Oberfläche von Mastzellen und eosinophilen sowie basophilen Granulozyten gebunden (Gould, 2003). Wie in 1.4 bereits beschrieben spielt IgE eine zentrale Rolle bei den immunologischen Abläufen einer allergischen Reaktion. Durch die hohe Konzentration von Mastzellen und IgE Antikörpern in Schleimhäuten gehören IgE-Antikörper zu den ersten Abwehrmolekülen, denen ein eindringendes Allergen begegnet. Die allergische Sofortreaktion vom Typ 1 ist dabei durch die Quervernetzung der IgE-Fc ϵ RI-Komplexe auf Mastzellen gekennzeichnet. Es folgen die Degranulation und die Ausschüttung von

Histaminen und weiteren Mediatoren, die für die charakteristischen Symptome verantwortlich sind (Platts-Mills, 2001). Auf diese „frühe Phase“ der allergischen Reaktion folgt die durch weitere Zytokine vermittelte „Spätreaktion“, die erst einige Stunden später ihren Höhepunkt erreicht und die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen in den betreffenden Geweben (z.B. Lunge, Nase, Gastrointestinaltrakt) beinhaltet. Auf ähnliche Weise aktivieren Allergene IgE-sensibilisierte APCs. Diese fördern wiederum die IgE-Produktion durch B-Zellen, um das bei der allergischen Reaktion verbrauchte IgE zu ersetzen, wodurch die Mastzellen- und APC-Sensibilisierung aufrechterhalten werden (Gould und Sutton, 2008).

Auch wenn die Rolle von IgE heute meist im Zusammenhang mit immunologischen Vorgängen bei allergischen Reaktionen diskutiert wird, ist eine „ursprüngliche“ (siehe unten) Aufgabe die Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) gegen Parasiten. Antigene parasitären Ursprungs induzieren durch Bindung und anschließende Quervernetzung der IgE-Fc ϵ RI-Komplexe auf eosinophilen Granulozyten die Freisetzung zytotoxischer Substanzen (Capron *et.al.*, 1994). Diese sorgen für eine unmittelbare lokale „chemische“ Bekämpfung der Parasiten. Es wird vermutet, dass der Ursprung von allergischen Reaktionen auf eigentlich harmlose Substanzen (z.B. Gräserpollen, Nahrungsmittel, Tierhaare) auf eine Fehlentwicklung des Immunsystems zurückzuführen ist. So gibt es Hypothesen, die eine Ursache in einer deutlich verringerten frühkindlichen Exposition zu Endotoxinen in modernen nicht-Agrargesellschaften sehen. Diese Hygienehypothese, auch im Zusammenhang mit Asthma, wird durch Studien untermauert (Braun-Fahrlander *et.al.*, 2002). Als möglicher Mechanismus wird eine Fehlregulierung im Verhältnis zwischen Th₁ und Th₂ dominierten Immunantworten vermutet. Durch eine im jungen Alter unterstimulierte Th₁ abhängige Immunantwort, werden die bei einer Allergie Th₂-vermittelten Reaktionen gefördert und resultieren in einer Überreaktion (Yazdanbakhsh *et.al.*, 2002).

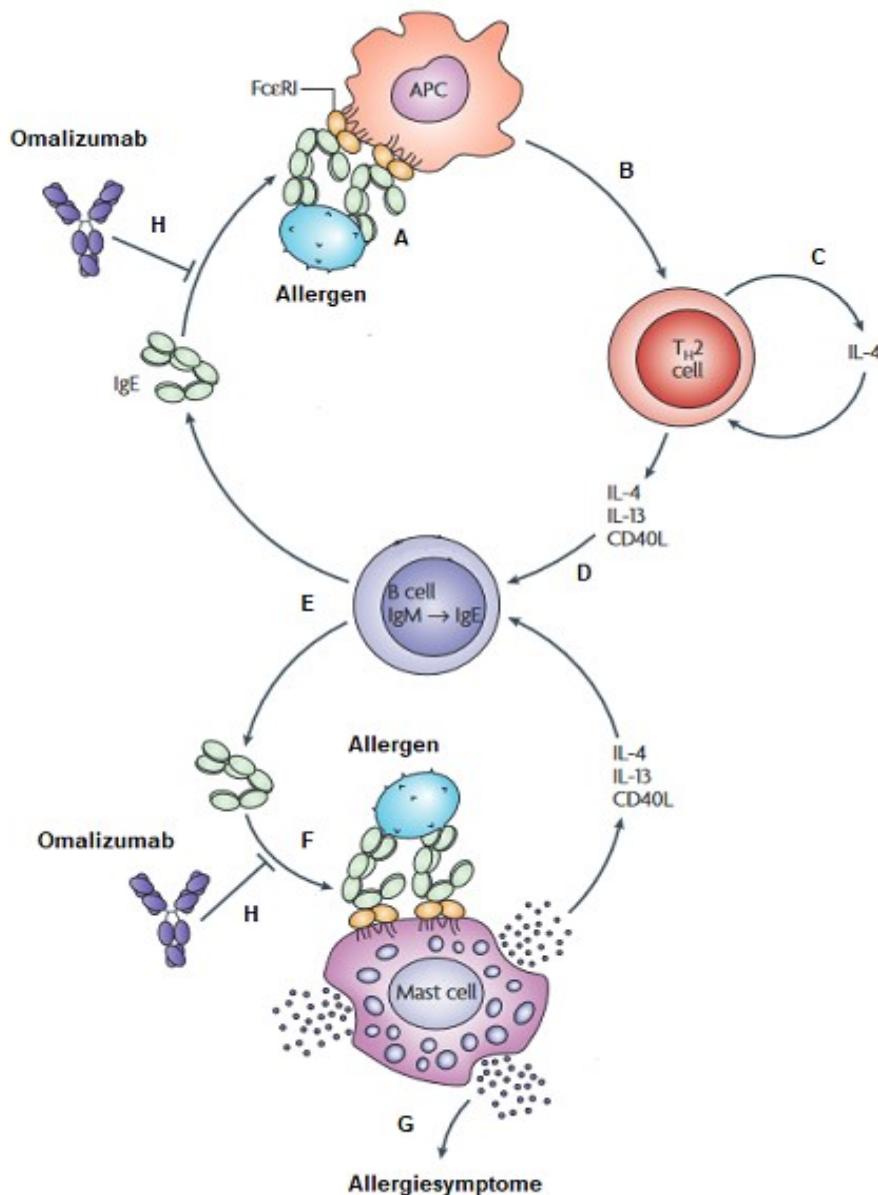


Abb. 2: Immunologische Reaktionskaskade einer allergischen Reaktion und Ansatzpunkte einer Antikörpertherapie mit Omalizumab. Quervernetzung von IgE durch Allergen und Stimulation von Antigenpräsentierenden Zellen (A), Antigenpräsentation und Aktivierung von Th₂-Helferzellen (B), Sezernierung von IL-4 führt zu einer Rekrutierung und Differenzierung weiterer Th₂-Helferzellen (C), IL-13 und IL-4 induzieren Klassenwechsel in B-Zellen (D), IgE Produktion durch B-Lymphozyten (E), Bindung von freiem IgE an Mastzellen (F), Durch Quervernetzung induzierte Mastzelldegranulation (G), Komplexierung und Neutralisierung von freien IgE-Antikörpern durch Omalizumab (H), (verändert nach Gould und Sutton, 2008).

1.5 Antikörpertherapien

Die enormen Fortschritte im Verständnis von immunologischen Abläufen, Zusammenhängen und auf dem Feld der Molekularbiologie im letzten Drittel des 20. Jahrhunderts ermöglichen eine völlig neue Herangehensweise an die Behandlung verschiedenster Erkrankungen. Mit Hilfe von sogenannten Biologicals, Moleküle, die nicht chemisch synthetisiert werden, sondern in verschiedensten biologischen Expressionssystemen maßgeschneidert produziert werden, konnten in den letzten Jahren enorme Fortschritte in fast allen Fachrichtungen der Medizin erreicht werden (Singh *et.al.*, 2018). Die sogenannten monoklonalen Antikörper (**monoclonal antibodies** = mABs) stellen dabei einen großen Teil dieser Biologicals dar. Therapeutische monoklonale Antikörper, die sich in ihrer Grundstruktur meist von IgG ableiten (Liu, 2014), richten sich gegen ein bestimmtes Epitop. Dieses Epitop kann Teil aller erdenklichen biologischen Moleküle und Strukturen sein. Neueste Methoden ermöglichen sogar intrazelluläre Strukturen als Ziel sogenannter „Intrabodies“ (Lo *et.al.*, 2008). Der Wirkmechanismus der verschiedenen mABs ist dabei so variabel wie ihre Zielstruktur. So können zum Beispiel Bindungsstellen für Signalmoleküle maskiert werden und so immunologische Kaskaden blockiert werden. Die Antikörper können sich auch direkt gegen ein Toxin (Neutralisation durch Aggregation oder Maskierung) oder Mikroorganismen selber richten und so das Immunsystem aktiv bei der Bekämpfung von Infektionen unterstützen. Durch die Fusion mit verschiedensten Molekülen wie Effektorproteinen, Toxinen oder radioaktiven Bestandteilen können mABs darüber hinaus für die gezielte Tumorthherapie eingesetzt werden (Pastan *et.al.*, 2006).

Die ersten monoklonalen Antikörper wurden mit Hilfe von sogenannten Hybridomazellen produziert, wobei murine antikörperproduzierende B-Lymphozyten mit Myelomzellen (ebenfalls murin) kombiniert wurden (Kohler und Milstein, 1975). 1982 wurde in Amerika die erste erfolgreiche Behandlung eines B-Zell Lymphoms mit monoklonalen Antikörpern erreicht (Miller *et.al.*, 1982). Die erste FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration) Zulassung für einen therapeutischen monoklonalen Antikörper erhielt 1986 Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®). Dieser wurde erfolgreich trotz schwerer Nebenwirkungen aufgrund des murinen Ursprungs (s.u.) gegen Abstoßungsreaktionen nach einer Nierentransplantation eingesetzt (Starzl und Fung, 1986). Seitdem wurden viele weitere

mABs für therapeutische Einsätze auf verschiedensten Gebieten zugelassen. Darunter fallen kardiovaskuläre, respiratorische, hämatologisch/onkologische, nephrologische oder bei Autoimmun- Erkrankungen (Singh *et.al.*, 2018).

Ein Hauptproblem bei der therapeutischen Anwendung von mABs waren die anfänglich häufig starken immunologischen bis hin zu anaphylaktischen Reaktionen (Zytokinsturm/CRS) gegen die meist aus Mäusezelllinien stammenden Antikörperbestandteile (Hansel *et.al.*, 2010). So waren die ersten mABs von ihrer Struktur her reine Mäuseantikörper. Sowohl der variable als auch der konstante Teil hatten ihren Ursprung in der murinen Zelllinie. Es folgten chimäre Antikörper mit einem humanen konstanten Teil und einem variablen Teil nicht humanen Ursprungs. Im Laufe der Jahre wurden mABs immer weiter „humanisiert“ und haben heute meistens einen großen humanen Anteil von 95% (Harding *et.al.*, 2010, Shahhosseini *et.al.*, 2007). Dies brachte enorme Fortschritte bei der Sicherheit und Wirksamkeit (Singh *et.al.*, 2018). Weitere Probleme sind aktuell die geringe Ausbeute bei den meisten Produktionssystemen und die damit verbundenen hohen Kosten (Liu, 2014). Die genetische Instabilität von Hybridoma Zelllinien und die sehr geringe Ausbeute mit diesem Expressionssystem (Li *et.al.*, 2010) führten zu neuen Methoden wie dem Phage-Display und der rekombinanten Produktion in *E.coli* (Chames *et.al.*, 2009). Mit Hilfe der komplexen Nomenklatur für therapeutische Antikörper lässt sich am Namen des mAB das Expressionssystem, der Grad der Humanisierung, das Ziel und mögliche Konjugate wie Toxine oder Radioisotope ablesen (Singh *et.al.*, 2018). Aktuell sind in Deutschland 6 verschiedene Biologika (Omalizumab, Mepolizumab, Reslizumab, Benralizumab, Dupilumab, Tezepelumab) zur Therapie des schweren Asthmas zugelassen. Tezepelumab ist ein Anti-TSLP-Antikörper der seit November 2022 zugelassen ist. Er bildet das jüngste Mitglied der Biologika, die in der antiasthmatischen Therapie eingesetzt werden. Derzeit liegen noch keine Studienergebnisse vor, ob unter Tezepelumab die OCS Dosis bei gleichbleibender Symptomkontrolle reduziert werden kann (Hackl *et. al.* 2023).

1.5.1 Omalizumab

Omalizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der unter dem Namen Xolair® seit 2005 auf dem deutschen Markt verfügbar ist. Der 145.1 kDA schwere Anti-Antikörper richtet sich gegen ein Epitop in dem konstanten Teil (Fc-Teil) des Immunglobulin E und wird in Ovarialzellen (CHO-Zellen) des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) produziert. Hergestellt und vertrieben wird Xolair® von dem Schweizer Pharmaunternehmen Novartis.

Ansatzpunkt einer Therapie mit Omalizumab stellt die bereits in Teil 1.4.1.1 und 1.4.3 angesprochene, zentrale Rolle von IgE in der Pathophysiologie von Asthma bronchiale und speziell bei schwerem allergischem Asthma (Slavin *et.al.*, 2009) dar. IgE kommt vor allem membrangebunden an Mastzellen vor und löst bei Aktivierung eine allergische Sofortreaktion vom Typ 1 aus (Gould *et.al.*, 2003). Omalizumab komplexiert freie IgE-Antikörper und verhindert somit deren Bindung an IgE-Rezeptoren auf Mastzellen (Humbert *et.al.*, 2014). Zudem reduziert Omalizumab die Aktivität und Anzahl der IgE-Rezeptoren (high-affinity FcεRI) auf der Oberfläche von Basophilen und Mastzellen, woraufhin weniger freies IgE gebunden werden kann. Dadurch wird die Freisetzung von weiteren Entzündungsmediatoren wie Histamin aus den Mastzellen und die IgE vermittelte Entzündung gehemmt (Chang, 2000).

Im Laufe der Jahre sind zudem aus verschiedenen Off-Lable-Use Anwendungen mehrere Nachfolgezulassungen für Xolair® entstanden. So ist seit 2014 Omalizumab als Zusatztherapie gegen chronische spontane Urtikaria bei Jugendlichen und Erwachsenen zugelassen und im August 2020 wurde Omalizumab, zusätzlich zu intranasalen Kortikosteroiden (INCS), bei erwachsenen Patienten mit chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP) zugelassen (Klimek *et.al.*, 2021).

1.6 Ziel der Arbeit

Schweres allergisches Asthma stellt ein sehr heterogenes Krankheitsbild dar, welches Ärzte regelmäßig bezüglich der Therapiewahl vor Herausforderungen stellt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Zytokinprofile von Th₂-Zellen ex vivo, die von Patienten mit schwerem allergischem Asthma vor und während einer Omalizumab-Therapie isoliert wurden, eine Endotypisierung erlauben, die die Antikörpertherapiewahl unterstützt. Gleichzeitig sollten die Untersuchungen der Zytokinprofile der Th₂-Zellen ex vivo vor und nach Stimulation mit Omalizumab das Verständnis der Pathomechanismen und ihrer Beeinflussung durch Omalizumab unterstützen. Bei den Asthmapatienten liegt ein diagnostiziertes schweres allergisches Asthma vor (allergische Reaktion vom Soforttyp, siehe 1.4). Im Fokus der Arbeit liegen dabei die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und TNF- α . Ausgesucht wurden diese Interleukine aufgrund ihrer Bedeutung bei der Exazerbation des schweren allergischen Asthmas. Im Zuge der Studie wurden Patienten während ihrer Omalizumab Therapie sowohl mehrmals klinisch untersucht, als auch ex vivo Stimulationsversuche mit von den Patienten gewonnenen T-Helferzellen durchgeführt. Durch den Vergleich der klinischen Patientendaten und den gewonnenen Daten der ex vivo Stimulationsversuche sollte ein immunologischer Zusammenhang zwischen Omalizumab-Therapie und einer Verbesserung der klinischen Symptomatik genauer untersucht werden. Dies könnte in Zukunft dabei helfen, Patientengruppen mit verschiedenen Phäno- und Endotypen vorab zu charakterisieren und so eine Therapieentscheidung auch im Hinblick auf neue therapeutische Antikörper zu erleichtern.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

| | |
|--|--------------|
| Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System | ThermoFisher |
| Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge | Heraeus |
| FLUOstar® Omega Plate Reader | BMG Labtech |

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchslösungen

| | |
|----------------------------|---------------|
| Ethanol absolute | AppliChem |
| Aqua Bidest, Excalibur | Labomedic |
| Dimethylsulfoxide (DMSO) | Sigma-Aldrich |
| Omalizumab 150mg/ml | Novartis |
| Ionomycin aus Streptomyces | Sigma-Aldrich |
| PMA | Sigma-Aldrich |

2.1.3 Verbrauchsmaterial

| | |
|--|-----------------------|
| Butterfly Nadeln | |
| EDTA – Röhrchen, S-Monovette® 9ml, | Sarstedt, Deutschland |
| Plasma – Röhrchen, BD P100 Blood Collection System | Becton |
| Serum – / RNA – Röhrchen, PAXgene® Blood RNA Tube | PreAnalytiX GmbH |
| Spritzen und Kanülen | Braun |
| Einfach und Mehrfachpipetten | Eppendorf |
| Pipettenspitzen | Greiner/Eppendorf |
| Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml) | Eppendorf |
| Falcons (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Serologische Pipetten | Greiner |

2.1.4 ELISA-Test-Kits

| | |
|---|-------------|
| Human IL-4 DuoSet (Lotnr.: 1352602) | R&D Systems |
| Human IL-5 DuoSet (Lotnr.: 329 488) | R&D Systems |
| Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (Lotnr.: P107 415) | R&D Systems |
| Human IL-13 Elisa KIT (Batch: 1013-40) | Diaclone |

2.1.5 MACS Zellseparierung

| | |
|-------------|------------------|
| Quadro Macs | Miltenyi Biotec® |
|-------------|------------------|

2.1.6 RNA Extraktions-Kit

PAXgene® Blood RNA Kit 50 v.2

PreAnalytix GmbH

2.1.7 cDNA-Synthese

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Applied Biosystems™

2.2 Rechtliche Grundlage/ Ethikkommission/ Ethikvotum Nummer: 161/15

Die Patientenuntersuchungen geschahen auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki, des Weltärztebundes 2013 und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen. Vor Studienbeginn wurden die Patienten sowie die gesunden Probanden der Kontrollgruppe über Nutzen und Risiken der beabsichtigten Forschung aufgeklärt und unterschrieben die Einwilligungserklärung mit der Möglichkeit, jederzeit die Einwilligung zu widerrufen.

Die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (unabhängige Kommission) sprach Ihre Zustimmung zu der medizinisch-wissenschaftlichen Arbeit aus.

2.3 Rekrutierung der Probanden und der Kontrollgruppe

Die Patientengruppe umfasste 19 Patienten (n=19), die im Rahmen der Routineversorgung in der Sektion Pneumologie behandelt wurden:

- Patienten mit schwerem allergischem Asthma sollten im Vorfeld möglichst keine Omalizumab Therapie erhalten haben. Sie sollten nach den GINA Leitlinien für eine Anti-IgE Therapie in Frage kommen (Stufe 5 nach GINA-Leitlinie).
- Ein positiver Prick Test oder eine *in vitro* Reaktion gegen ein Aeroallergen bestehend seit mindestens einem Jahr
- Eine reduzierte Lungenfunktion (FEV1 < 80%)
- Persistierende Asthma Symptome tagsüber oder nächtliches Aufwachen aufgrund der Symptomatik

- Eine bekannte dokumentierte Exazerbation des schweren allergischen Asthmas trotz täglicher Therapie mit hoch dosierten inhalativen Corticosteroiden (ICS) oder inhalativen β -2 Agonisten (SABA/LABA)
- Ein vermutetes IgE vermitteltes Asthma bei IgE Serumkonzentrationen ≥ 76 IE/ml und ≤ 1500 IE/ml zum Zeitpunkt des Therapiebeginns.

Ausgeschlossen wurden Patienten jünger als 18 Jahre, Patienten mit Komorbiditäten, sowie Leber- und Nierenerkrankungen, Diabetiker, Glukose/Galaktose Malabsorption, Fruktose Intoleranz oder Saccharose-Isomaltose Mangel sowie Patienten mit einem Körpergewicht ≥ 150 kg oder mit bekannten Lebensmittelallergien. Alle Patienten sowie Teilnehmer der Kontrollgruppe waren Kaukasier.

Die gesunden Probanden der Kontrollgruppe (n=10) wurden vom Blutspende Zentrum der Universitätsklinik Bonn rekrutiert. Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis. Anschließend wurde 10 gesunden Probanden Blut entnommen und untersucht. Jeweils ein Differentialblutbild mit Immunstatus wurde aus EDTA Blut gewonnen (Auswahlkriterien: gesund, keine Raucher, keine Erkältung, kein Asthma bronchiale).

Den Patienten, sowie den 10 gesunden Probanden der Kontrollgruppe wurde zu Beginn der Studie (Baseline), nach 3 Monaten (1. Follow up) und nach 6 Monaten (2. Follow up) Blut abgenommen.

2.4 Medikation

Um eine mögliche allergische Reaktion auf die Therapie auszuschließen, wurde den Patienten routinemäßig bei Studieneinschluss eine Omalizumab Testdosis, gefolgt von einer zweistündigen ärztlichen Überwachung, verabreicht.

Anschließend wurde unter Berücksichtigung des IgE-Titers und des BMI eine individuelle Omalizumab Dosis bestimmt und entweder in der pneumologischen Ambulanz oder in der ambulanten fach- bzw. hausärztlichen Versorgung in vierwöchigen Abständen subkutan injiziert.

2.5 Verlaufskontrolle der Patienten

2.5.1 Klinische Untersuchungen

Die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen (2.3.1.1-2.3.1.2) wurden vom Personal der pneumologischen Ambulanz der Uniklinik Bonn durchgeführt.

2.5.1.1 Forcierte expiratorische Volumen (FEV1)

Um eine Veränderung des klinischen Befundes der Patienten zu dokumentieren, wurde eine Bodyplethysmographie durchgeführt. Hierbei wurden die funktionelle Einsekundenkapazität (FEV1), die inspiratorische Vitalkapazität (IVC), der FEV1/IVC – Quotient, die Resistance der Lunge, das Totraumvolumen, sowie das Residualvolumen gemessen. Die funktionelle Einsekundenkapazität ist die Luftmenge, die mit aller Kraft und möglichst schnell innerhalb einer Sekunde nach maximaler Inspiration ausgeatmet werden kann. Je stärker die Bronchien verengt sind, desto weniger Luft kann in einer Sekunde ausgeatmet werden. Durch den Vergleich mit geschlechts- und körpergrößenabhängigen Sollwerten dient die Einsekundenkapazität als Maß zur Beurteilung der Lungenfunktion.

2.5.1.2 Fraktioniertes exhalierendes Stickstoffmonoxid (FeNO)

Als Maß für die Schwere der Atemwegsentszündung wurde das fraktionierte exhalierende Stickstoffmonoxid (FeNO) gemessen. Stickstoffmonoxid ist ein anerkannter Biomarker, der in Folge von entzündlichen Prozessen im Bronchialgewebe freigesetzt wird. Dabei korreliert die gemessene Konzentration direkt mit der Schwere der Entzündung. Die quantitative Erfassung des ausgeatmeten Stickstoffmonoxids ist dabei eine nicht invasive unkomplizierte Methode für eine objektive Erfassung allergischer/eosinophiler Entzündungen der Atemwege und wird als Verlaufskontrolle des Asthma bronchiale genutzt.

2.5.1.3 Patientenbefragung/Asthma Control Test

Die subjektive Veränderung der Symptomatik und vor allem der Lebensqualität im Alltag der Patienten wurden mit dem Asthmakontrolltest (ACT Copyright 2002 QualityMetric Incorporated) untersucht. Der ACT-Test besteht aus fünf Fragen. Jede Frage wird mit einem Punktwert von eins (schlechteste Asthmakontrolle) bis fünf (beste Asthmakontrolle) bewertet. Anschließend wird die Summe gebildet und es ergibt sich ein Gesamtpunktwert zwischen minimal fünf und maximal fünfundzwanzig Punkten. Dabei bedeuten 20-25 Punkte eine gute Asthmakontrolle, 16-19 Punkte eine annehmbare Asthmakontrolle und weniger als 15 Punkte eine schlechte Asthmakontrolle (GSK 2017).

Des Weiteren wurden die Patienten nach dem Vorhandensein einer allergischen Rhinokonjunktivitis und oder oberen Atemwegsinfektionen, Exazerbationen innerhalb der letzten drei Monate oder akuten Exazerbationen bei Studieneinschluss, sowie zwischen ersten und zweiten Follow up befragt und die Ergebnisse dokumentiert. Anschließend wurde eine Differenzierung der Exazerbation in allergisch, gemischt, oder nicht allergisch vorgenommen und gegebenenfalls die Medikation der Patienten an die klinische Symptomatik angepasst (Parasympatholytika, Beta-2-Sympathomimetika, ICS).

2.6 Labor

Um die notwendigen und gewünschten Blutwerte zu ermitteln und die weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen (siehe 2.6.1-2.6.4) durchzuführen, wurde den Probanden über die Armvene 50 ml Blut entnommen und in EDTA-Röhrchen gelagert.

Ein Teil (34 ml) des abgenommenen Blutes wurde im Zentrallabor der Uniklinik Bonn analysiert und folgende Werte bestimmt: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Erythrozyten-Verteilungskoeffizient, Thrombozyten, MPV, Normoblasten, Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile Granulozyten, Basophile Granulozyten, unreife Granulozyten, B-Zellen (CD19+), NK-Zellen (CD16+, CD56+), T-Lymphozyten (CD3+), T-Helferzellen (CD3+, CD4+), T-Suppressorzellen (CD3+, CD8+), CD4/CD8 - Verhältnis, CRP, Interleukin-6, Interleukin-8, IL-2 Rezeptor, 25-Hydr.-Vitamin D, 1,25-Dihydr.-Vitamin D, ECP, IgE, Kalium, Kreatinin, glomeruläre Filtrationsrate MDRD4, ALT (GPT) 37°C, AST (GOT) 37 °C,

Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-13 und TNF-alpha. Die Bestandteile der zellulären Immunabwehr wurden jeweils prozentual und absolut bestimmt.

Der andere Teil (16 ml) des entnommenen Blutes wurde für die Isolierung der Immunzellen und der RNA, sowie der Gewinnung von Blutplasma und Blutserum verwendet. Diese Bearbeitungsschritte erfolgten im Labor der Medizinischen Klinik III, AG Ulrich-Merzenich.

2.6.1 Zellisolierung

Aus dem Blut der Patienten und gesunden Probanden wurden CD4⁺-Zellen isoliert. Die Trennung der Lymphozyten von den restlichen Bestandteilen des Blutes erfolgte mit Hilfe der Magnetic Cell Separation Methode (MACS). Die MACS Methode basiert auf Antikörper gekoppelten etwa 50 nm großen magnetischen Kügelchen (Abb.3). Diese koppeln sich spezifisch an die gewünschten Zielzellen und werden anschließend über eine Säule, aufgrund Ihrer magnetischen Eigenschaften, zusammen mit den Zielzellen von anderen Bestandteilen einer Zellsuspension (Blut) getrennt.

Dazu wurde 7,5 ml EDTA-Blut mit 375 µl MicroBeads für die Kopplung mit CD4⁺-Zellen für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Bindung der MicroBeads an die Zielzellen der EDTA-Blut Probe (magnetic labeling) wurden die 7,5 ml Blutprobe auf equilibrierte 3 ml Säulen gegeben (magnetic separation). Die Säulen sind in einer magnetischen Halterung (Quadro Macs, Miltenyi Biotec®) fixiert, welche dafür sorgt, dass die an MicroBeads gebundenen Zellen in der Säule verbleiben und unmarkierte Zellen, sowie die restlichen Bestandteile des EDTA-Blutes ungehindert die Säule passieren können. Anschließend wurde die Säule zweimal mit MACS Puffer gewaschen, um fehlerhaft gebundene Zellen, sowie weitere in der Säule verbliebene Bestandteile des Blutes zu entfernen. Danach wurde die Säule aus der magnetischen Halterung entfernt und auf ein leeres 15 ml fassendes Falcon Röhrchen gestellt. Anschließend wurden 4 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und zusätzlich mit einem Stempel Druck aufgebaut, um die Zielzellen aus der Säule zu spülen. Die eluierten Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und direkt nach einem genauen Einfrierprotokoll eingefroren. Dabei wird das Zell-Pellet nach der Zentrifugation in einem speziellen Freezing-Medium resuspendiert und in ein Cryo-

röhrchen überführt. Dieses wurde für drei Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend über Nacht im $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tiefkühlschrank gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Proben in einen Flüssigstickstoff Behälter zur dauerhaften Aufbewahrung überführt.

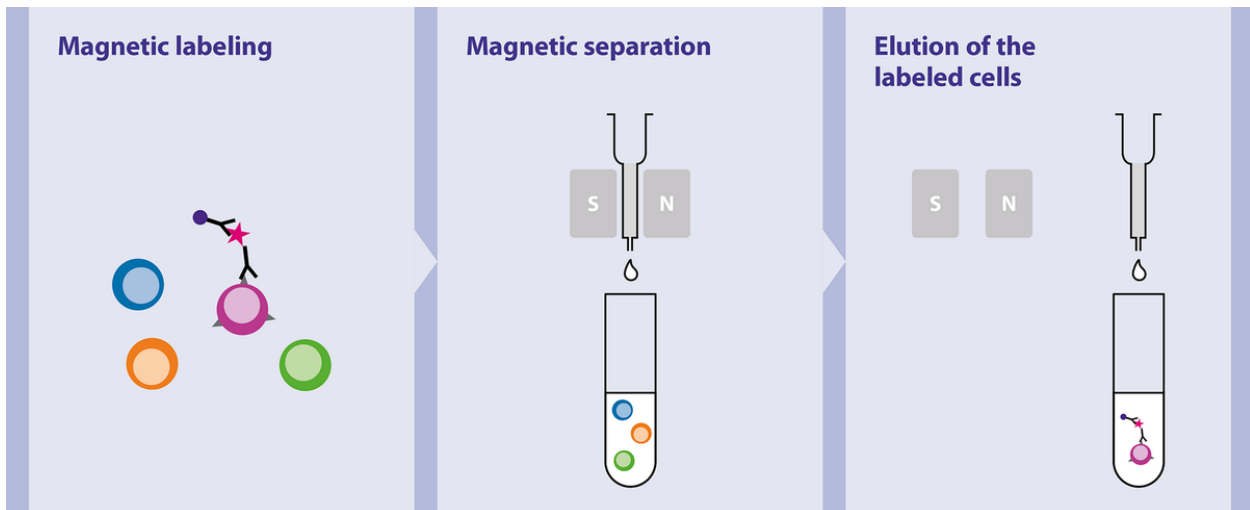


Abb. 3: Schematische Darstellung der MACS-Methode. Über passende Antikörper werden die Zielzellen magnetisch markiert, anschließend werden die Zielzellen in der Aufreinigungssäule über ein magnetisches Feld zurückgehalten während alle anderen Bestandteile des Blutes ausgewaschen werden. Das magnetische Feld wird nun von der Säule entfernt, danach können die Zielzellen eluiert werden (Quelle: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macs-cell-separation/macs-cell-separation-strategies.html> mit Genehmigung durch Miltenyi BiotecS).

2.6.2 Zellstimulation

Unter dem Mikroskop wurde mit Hilfe einer Neubauer® Zählkammer die Zellzahl pro Milliliter, der in 2.6.1 gewonnenen Zellsuspensionen bestimmt. Anschließend wurde die Probe mit Nährmedium auf eine Konzentration von 1 Millionen Zellen pro Milliliter verdünnt. Danach wurden die Zellen auf einer 96 Well Mikrotiterplatte ausplattiert (jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ pro Well, $100.000\text{ cells/well}$). Den Wells wurden verschiedene Konzentrationen von Omalizumab zugesetzt ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$, $50\text{ }\mu\text{g/ml}$, $75\text{ }\mu\text{g/ml}$, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$). Anschließend wurden außer den Negativkontrollen alle übrigen Zellen mit PMA/IO stimuliert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. 23 Stunden nach der Stimulation wurden die Zell-Überstände abpipettiert und für die zukünftige Antikörper-titerbestimmung mit Hilfe von ELISA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

2.6.3 ELISA

Die Quantifizierung der Zytokine (TNF- α und Interleukine) erfolgte mit Hilfe der ELISA (solid phase sandwich enzyme linked Immunosorbent Assay) - Methode. Die aus Patientenblutproben gewonnenen Lymphozyten (2.6.1) wurden wie in 6.2.2 beschrieben für Zellstimulationsversuche genutzt. Die gewonnenen Zellüberstände wurden anschließend mittels ELISA auf eine spezifische Zytokinkonzentration getestet.

Die Basis dieser Methode bildet eine hoch spezifische Antigen-Antikörper Reaktion. Das nachzuweisende Antigen, in diesem Falle die verschiedenen Zytokine, werden durch spezifische Antikörper gebunden. Der Nachweis erfolgt über eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion, welche anschließend mit Hilfe eines Photometers bei 450 nm quantifiziert wurde. Verwendet wurden ELISA Komplettsysteme der Firma Diaclone und R&D Systems.

In einem ersten Schritt wurden 100 μ l der Proben, der verdünnten Standards und der Negativkontrolle in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert, diese sind mit spezifischen Antikörpern (capture-Antikörpern) beschichtet und binden das Zielmolekül (zu detektierendes Zytokin) (Abb.4, **1+2**). Anschließend wurden 50 μ l biotinylierte Detektionsantikörper in jedes Well gegeben. Diese binden an ein anderes Epitop des Zielmoleküls und formen somit einen „sandwich-Komplex“ (Abb.4, **3**). Nach einem 90-minütigen Inkubationsschritt bei RT wurde die Platte dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Danach wurden in jedes Well 100 μ l einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase=HRP) Lösung appliziert. Während der folgenden 30-minütigen Inkubationszeit bei RT bindet der Streptavidin-Enzymkomplex an den biotinylierten Detektionsantikörper (Abb.4, **4**). Anschließend wurde die gesamte Mikrotiterplatte erneut dreimal mit Waschpuffer gespült. Durch die Zugabe des Substrats TMB (**T**etramethyl**b**enzidin) kommt es zu einer durch die HRP katalysierte Redoxreaktion (Farbreaktion), deren Intensität proportional zu der Menge an gebundenen Zielmolekülen ist (Abb.4, **5**). Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von H₂SO₄ gestoppt und die Platten in einem Platerreader ausgewertet.

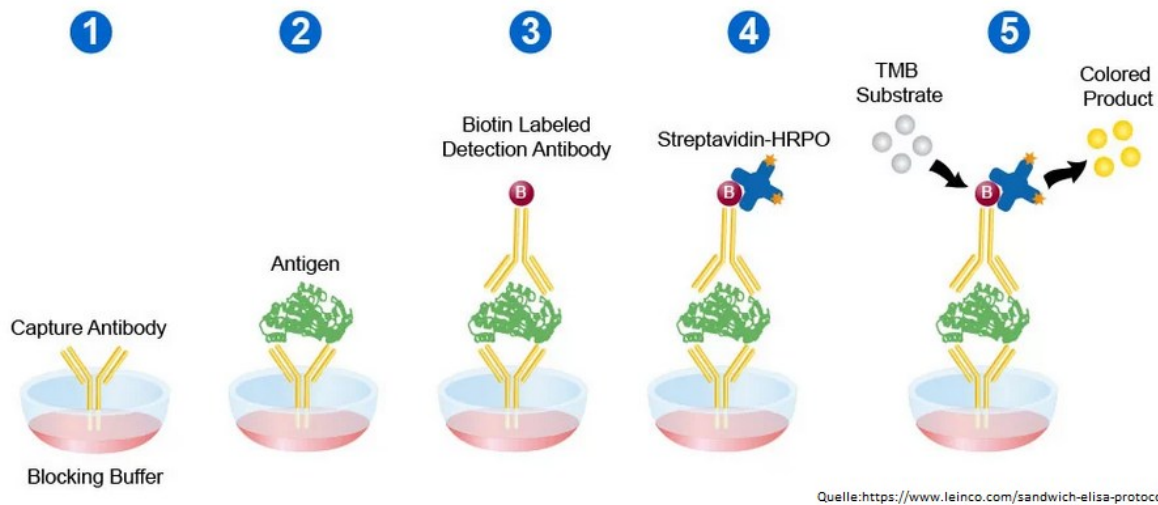


Abb. 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Sandwich ELISA mit Streptavidin-Biotin Detektionssystem (Quelle: Sandwich ELI <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/> SA Protocol Guide | Leinco Technologies).

2.6.4 RNA-Isolierung

Die RNA Isolierung aus den Blutproben erfolgte mit Hilfe des PAXgene® Blood RNA Kit der Firma PreAnalytix. Die Aufreinigung und Isolation erfolgte wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben. Nach dem enzymatischen Verdau der enthaltenen Proteine folgten verschiedene Waschschriffe. Die DNA/RNA Suspension wurde anschließend auf eine Bindungssäule aufgetragen, um alle enthaltenen Nukleinsäuren an dem Säulenmaterial zu binden. Es folgte ein enzymatischer Verdau der DNA gefolgt von einem erneuten Waschschriff. Die am Säulenmaterial gebundene RNA wurde anschließend mit einem Elutionspuffer eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.5 cDNA-Synthese aus RNA

Die Umschreibung der aus den Blutproben gewonnenen RNA in cDNA erfolgte mit einem Kit von Applied Biosystems und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 500 ng RNA Ausgangsmaterial eingesetzt.

2.6.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (Rt-qPCR)

Die Reverse-Transkriptase-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wurde genutzt, um die Expressionslevel verschiedener Gene, die für die Zytokinproduktion verantwortlich sind, zu untersuchen. Bei diesem Verfahren wird zuerst die mRNA durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben (2.6.4.1) und anschließend eine quantitative Echtzeit PCR durchgeführt. Folgende Interleukine und Chemokine wurden mittels RT-PCR gemessen: IL2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL17A, IL-33, INF, TNF- α . Als Primer wurde auf validierte TaqMan®-Primer zurückgegriffen (siehe Tab. 2). Jeweils 10 μ l des gebrauchsfertigen TaqMan-Genexpressions-Mastermix wurden mit 1 μ l cDNA Template gemischt und auf 96 Mikrotiterplatten ausplattiert. Tab.1 zeigt das verwendete Programm. Die PCR-Reaktionen und die Auswertung erfolgten mit einem TaqMan® Thermal Cycler 7300-System von Thermofisher. Als Referenzgen (Haushaltsgen) wurde die 18S-rRNA eingesetzt. Das Gen, welches für die kleine Untereinheit der cytosolischen 80s Ribosomen kodiert, wird in jeder eukaryotischen Zelle konstitutiv exprimiert und diente als Grundlage für die Berechnung der x-fachen Veränderung der Genexpression mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Zum Vergleich der Patientengruppen werden die Ergebnisse als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet, wie zuvor beschrieben (Abdel-Aziz *et. al.*, 2015). Die Ergebnisse wurden als x-fache Änderungen der Genexpression im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe der gesunden Probanden ausgedrückt.

Tab. 1: qRT-PCR Programm

| Thermal cycling conditions | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|
| Stufe | Temperatur (°C) | Zeit (mm:ss) |
| Hold (UNG activity) | 50 | 2:00 |
| Hold | 95 | 10:00 |
| Cycle (40x) | 95 | 0:15 |
| | 60 | 1:00 |

Tab. 2: TaqMan®-Primer

| Genprodukt | GenSymbol | Gene ID | TAQ-Man Primer ID |
|--|---------------|---------|-------------------|
| Interleukin 2 | IL-2 | 3558 | Hs00174114_m1 |
| Interleukin 4 | IL-4 | 3565 | Hs00174122_m1 |
| Interleukin 5 | IL-5 | 3567 | Hs01548712_g1 |
| Interleukin 5 | IL-5 | 3567 | Hs00174200_m1 |
| Interleukin 6 | IL-6 | 3569 | Hs00985639_m1 |
| Interleukin 8 | IL-8 | 3576 | Hs00174103_m1 |
| Interleukin 10 | IL-10 | 3586 | Hs00961622_m2 |
| Interleukin 13 | IL-13 | 3596 | Hs00174379_m1 |
| Interleukin 17A | IL-17A | 3605 | Hs00174383_m1 |
| Interleukin 33 | IL-33 | 90865 | Hs00369211_m1 |
| Interferon γ | IFN- γ | 3458 | Hs00989291_m1 |
| Tumor necrosis factor α | TNF- α | 7124 | Hs01113624_g1 |
| Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (FAM /MGB) | RNA18S5 | - | Hs03928990_g1 |

3. Ergebnisse

Diese Doktorarbeit ist Teil eines größeren Projekts der AG Synergy der Med III der Uniklinik Bonn unter Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Ulrich-Merzenich. Daher wurde teilweise auf bereits erhobene Ergebnisse anderer Mitarbeiter oder Doktoranden zurückgegriffen und/oder begonnene Experimente zu Ende geführt.

Die vorliegenden Ergebnisse beinhalten die Auswertung der Laborversuche mit isolierten Th₂-Zellkulturen der Patienten (n=19) und der gesunden Probanden (n=10), der Zusammenfassung der Ergebnisse aus den klinischen Untersuchungen der Lungenfunktion und der Patientenbefragungen.

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung und des ACT wurden in drei Diagrammen zusammengefasst (3.1.1-3.1.3).

Die Darstellung der Messergebnisse der Zytokin Ausschüttung aus den Zellkulturversuchen (IL-4, IL-5, IL-13 und TNF- α) erfolgte für jedes Zytokin in einem eigenen Diagramm (3.2.1-3.2.4).

3.1 Klinische Untersuchungen

3.1.1 FEV1

Als objektives Maß der Funktionsfähigkeit der Lunge beziehungsweise der Verengung der Bronchien wurde bei 19 Patienten das forcierte expiratorische Volumen (Einsekundenkapazität) gemessen (siehe MM. 2.5.1.1). Der FEV1-Wert der Patienten stieg im Verlauf der Behandlung von durchschnittlich 1,91 L bei Studienbeginn über 2,17 L nach drei Monaten auf einen Wert von 2,38 L zum Studienabschluss nach sechs Monaten. Das entspricht eine Erhöhung des FEV1 Wertes um durchschnittlich ca. 25 % innerhalb des sechsmonatigen Behandlungszeitraums.

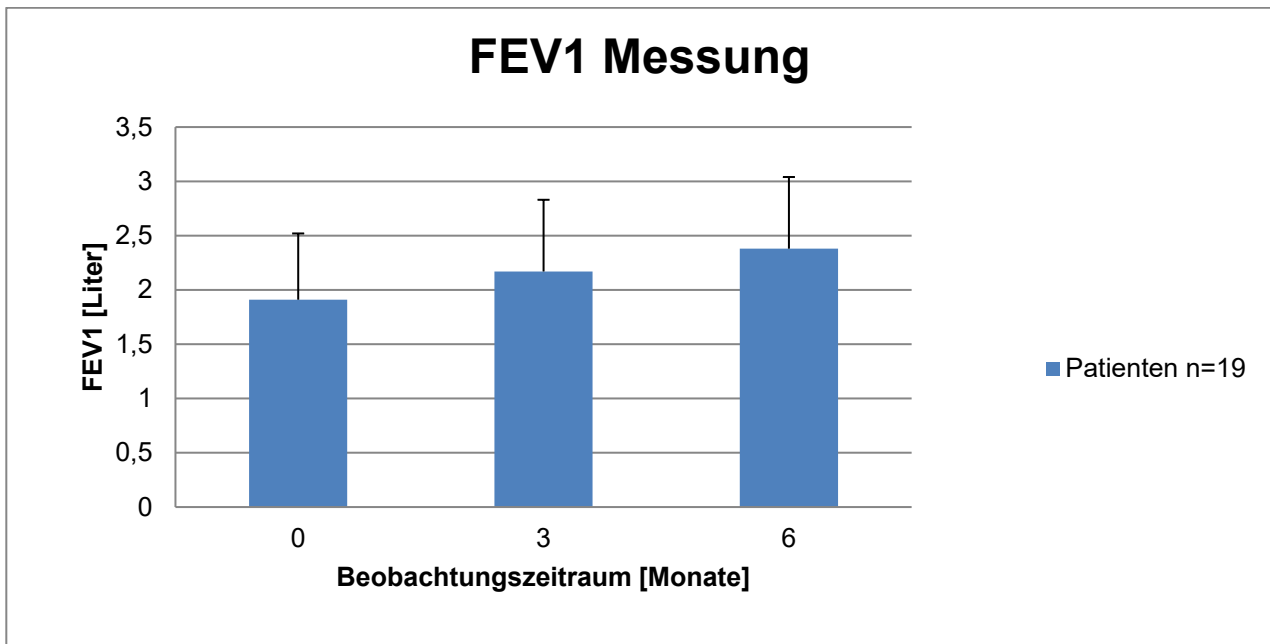


Abb. 5: Durchschnittliche forcierte Einsekundenkapazität (FEV1). Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Forcierte Einsekundenkapazität in Litern. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Gesamtgruppe der Patienten (n=19).

3.1.2 FeNO

Eine Messung des ausgeatmeten Stickstoffmonoxids (NO) gilt als zuverlässige, leicht durchzuführende und nicht invasive Methode zur objektiven Erfassung des inflammatorischen Zustandes der Lunge (siehe Material & Methoden 2.5.1.2). Zum Studieneinschluss lag die durchschnittliche Konzentration des exhalieren Kohlenmonoxids bei 51,9 ppb (Abb. 6). Nach drei Monaten sank der Wert leicht um ca. 7 % auf durchschnittlich 48,4 ppb. Nach weiteren drei Monaten konnte eine signifikante Reduzierung der NO-Werte um weitere 50% auf durchschnittlich 24,4 ppb gemessen werden.

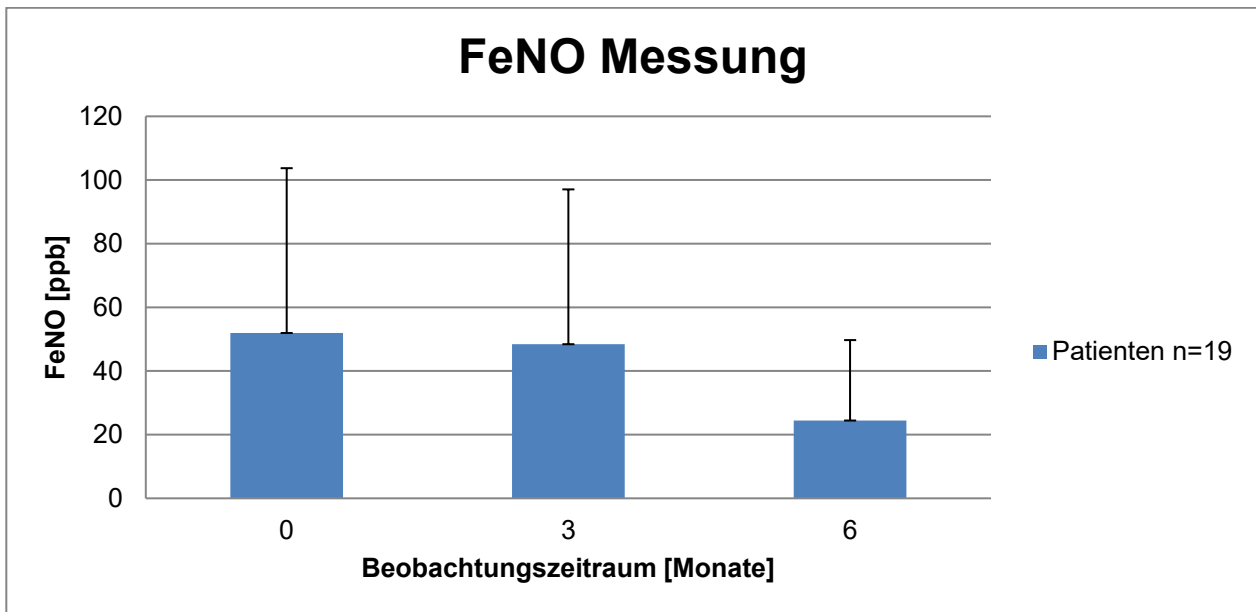


Abb. 6: Fraktioniertes exhalierendes Stickstoffmonoxid. Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Fraktioniertes exhalierendes Stickstoffmonoxid in der Einheit parts per billion (=Teile pro Milliarden). Dargestellt sind immer die arithmetischen Mittelwerte der Gesamtgruppe der Patienten (n=19).

3.1.3 ACT (Asthma Control Test)

Der Asthma Control Test (ACT) ist ein international angewandter Patientenfragebogen mit standardisiertem Punktesystem. Er dient der subjektiven Erfassung der Asthmakontrolle der letzten vier Wochen (siehe Material & Methoden 2.5.1.3). Zu Studienbeginn ergab die Auswertung einen durchschnittlichen Wert von 14,7 Punkten (Abb.7). Nach drei Monaten stieg der Wert um 19 % auf durchschnittlich 17,6 Punkte. Nach Abschluss der sechsmonatigen Behandlung lag der Punktwert bei 20, was einer erneuten Steigerung von 13 % entspricht.

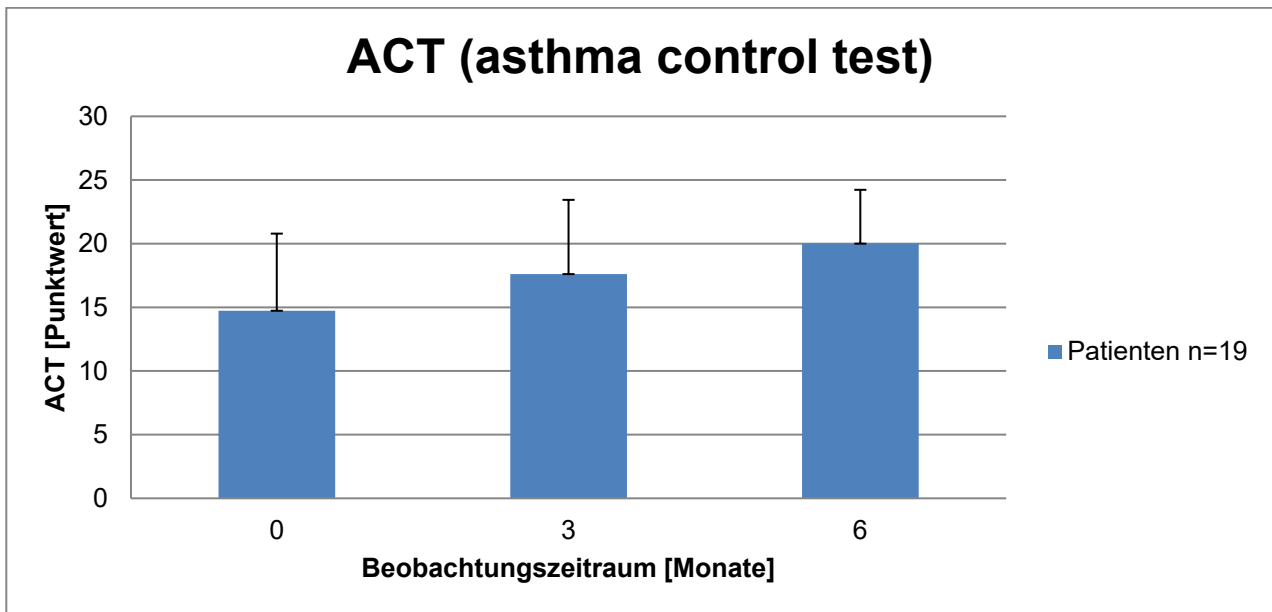


Abb. 7: Ergebnisse des Asthma control Test (ACT). Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Errechnete/Zusammengefasste dimensionslose ACT Punktwerte. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Gesamtgruppe der Patienten (n=19).

3.2 Zellkultur

In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse der Laborversuche zusammengestellt. Die Ausschüttung der verschiedenen Zytokine wurde mit Hilfe von spezifischen ELISA (siehe Material & Methoden 2.6.3) analysiert. Ausgangsmaterial für die ELISA waren die Zellüberstände der stimulierten oder nicht stimulierten CD4⁺ Zellen (siehe Material & Methoden 2.6.1). Dabei wurden die Reaktion der Zellen auf vier verschiedenen Omalizumab Konzentrationen zwischen 25 µg/ml und 100 µg/ml getestet (siehe Material & Methoden 2.6.2).

3.2.1 IL-4 Freisetzung

In Abbildung 8 sind die IL-4 Konzentrationen in Zellüberständen von nicht stimulierten, stimulierten und mit verschiedenen Omalizumab Konzentrationen behandelten CD4⁺ Zellen zu sehen. Bei nicht stimulierten Zellen (Baseline) konnte eine geringe und über den Studienverlauf von sechs Monaten relativ konstante Interleukin Ausschüttung zwischen

12 pg/ml und 21 pg/ml festgestellt werden. Mit PMA/IO stimulierte Zellen dienten als Positivkontrolle und als Maß für die Stimulierbarkeit der Zellen. Die Konzentration von IL-4 in Zellüberständen der mit PMA stimulierten Zellen nahm im Verlauf der sechs Monate von 60 pg/ml (Studieneinschluss) über 89 pg/ml auf 114 pg/ml stetig zu. Die Reaktion der Zellen auf eine Stimulation mit den angegebenen (25-50-75-100 µg/ml) Omalizumab Konzentrationen schwankte zum Studieneinschluss ohne klare Tendenz unterhalb der PMA/IO-Kontrolle (60 pg/ml) zwischen 41 pg/ml und 49 pg/ml. Nach drei Monaten lagen die Konzentrationen, unter Berücksichtigung der statistischen Abweichung, im Bereich der Werte der mit PMA/IO stimulierten Zellen (89 pg/ml) zwischen 87 pg/ml und 103 pg/ml. Nach sechs Monaten konnten bei allen eingesetzten Omalizumab Konzentrationen höhere IL-4 Konzentrationen in den Zellüberständen gemessen werden. Die Werte lagen zwischen 93 pg/ml und 125 pg/ml und damit im Bereich der Konzentration der mit PMA/IO Stimulierten Zellen (114 pg/ml).

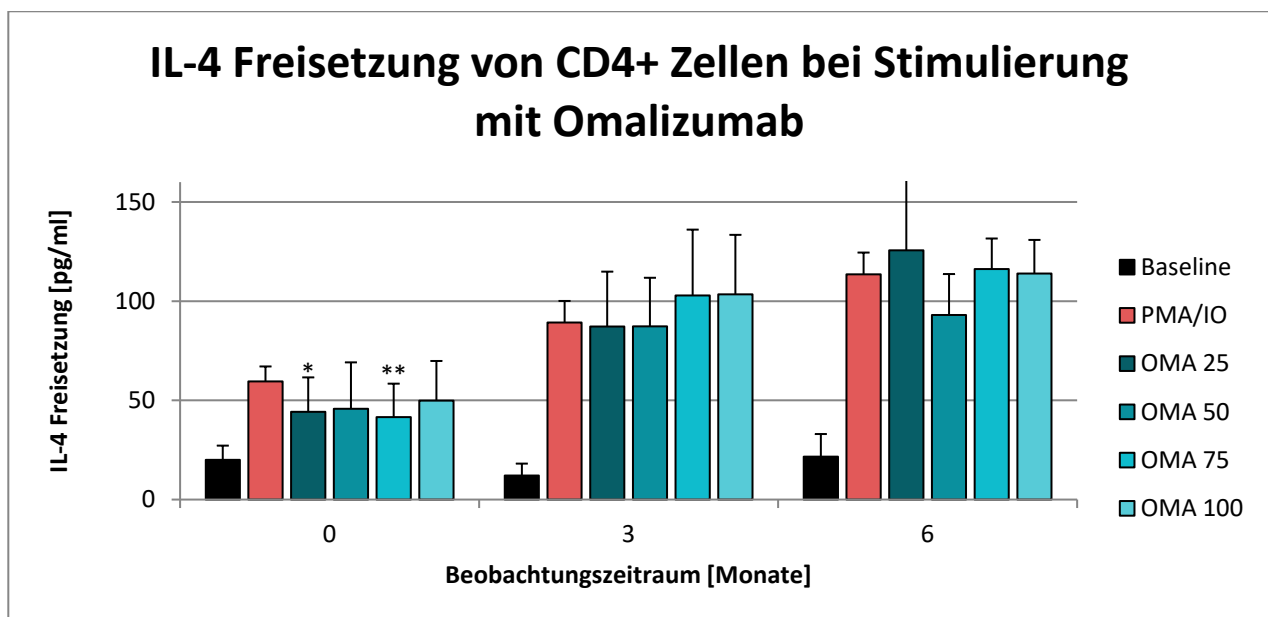


Abb. 8: IL-4 Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehandelter CD4+ Zellkulturen. Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Gemessenen IL-4 Freisetzung in pg/ml. Bei allen Säulen ist die Standardabweichung mit dargestellt (n=19). Signifikante Veränderungen der mit Omalizumab (OMA µg/ml) stimulierten Zellen zu den mit PMA/IO behandelten Zellen sind mit Sternchen (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$) gekennzeichnet. Abk. PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat, IO: Ionomycin

3.2.2 IL-5 Freisetzung

In Abbildung 9 sind die IL-5 Konzentrationen in Zellüberständen von nicht stimulierten, stimulierten und mit verschiedenen Omalizumab Konzentrationen behandelten CD4⁺ Zellen zu sehen. Die gemessenen IL-5 Konzentrationen in den stimulierten Zellen lagen zum Studieneinschluss bei 115 pg/ml und damit deutlich über dem Messwert der nicht stimulierten Zellen (2 pg/ml). Nach drei Monaten konnten mit 107 pg/ml für die stimulierten und 2 pg/ml für die nicht stimulierten Zellen ähnliche Werte gemessen werden. Nach sechs Monaten fiel die IL-5 Konzentration der mit PMA/IO stimulierten Zellen im Vergleich zu dem Messwert nach drei Monaten deutlich um den Faktor 5 auf 20 pg/ml. Die mit verschiedenen Omalizumab Konzentrationen behandelten Zellen unterschieden sich zum Studieneinschluss nicht stark in Ihrer IL-5 Ausschüttung. Diese lag zwischen 99 pg/ml und 112 pg/ml. Nach drei Monaten konnte eine leichte Zunahme der IL-5 Konzentration mit steigender Omalizumab Gabe gemessen werden. Die Messwerte der IL-5 Konzentration in den Zellüberständen stiegen auf 109 pg/ml für die niedrigste Omalizumab Konzentration bis auf 130 pg/ml bei der höchsten Omalizumab Konzentration von 100 µg/ml. Nach sechs Monaten lagen die gemessenen IL-5 Konzentrationen in den Zellüberständen der behandelten Zellen mit 18 pg/ml bis 20 pg/ml im Bereich der mit PMA/IO stimulierten Zellen (21 pg/ml), wobei keine großen Unterschiede innerhalb der vier applizierten Omalizumab Konzentrationen zu beobachten waren.

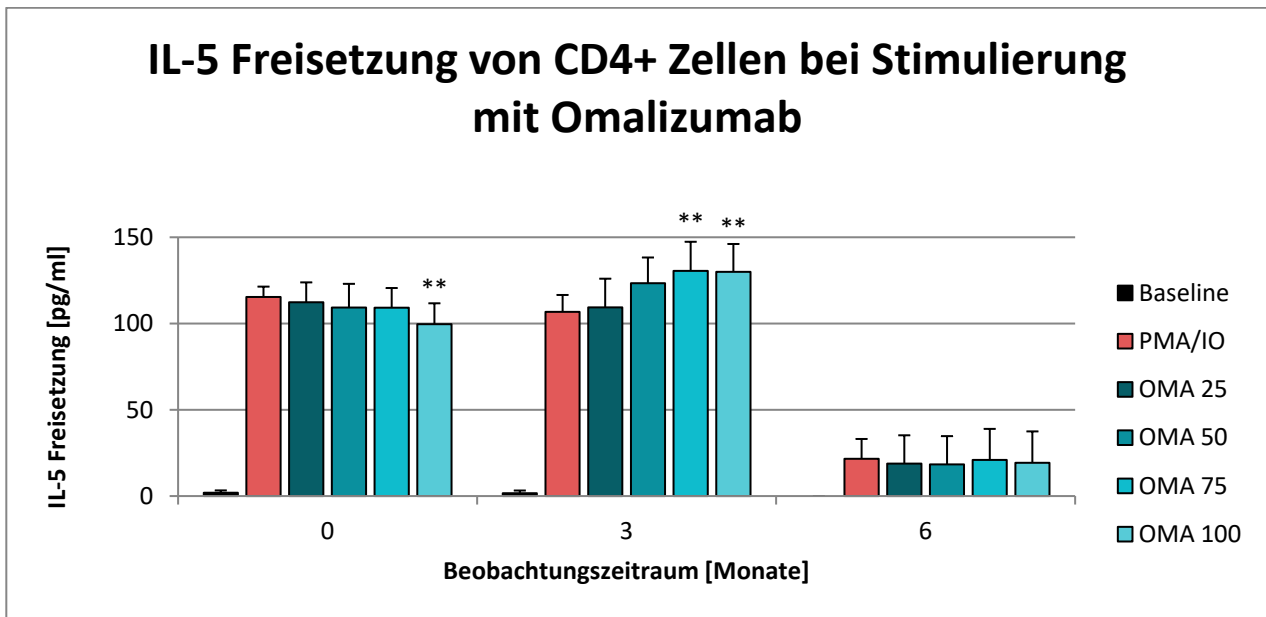


Abb. 9: IL-5 Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehaltener CD4+ Zellkulturen. Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Gemessenen IL-5 Freisetzung in pg/ml. Bei allen Säulen ist zusätzlich die Standardabweichung mit dargestellt (n=19). Signifikante Veränderungen der mit Omalizumab (OMA µg/ml) stimulierten Zellen zu den mit PMA/IO behandelten Zellen sind mit Sternchen (*p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001) gekennzeichnet. Abk. PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat, IO: Ionomycin.

3.2.3 IL-13 Freisetzung

In Abbildung 10 sind die IL-13 Konzentrationen in Zellüberständen von nicht stimulierten, stimulierten und mit verschiedenen Omalizumab Konzentrationen behandelten CD4⁺Zellen zu sehen. Im Verlauf der sechs Monate blieben sowohl die Messwerte der nicht stimulierten Zellen mit Werten zwischen 2 pg/ml und 12 pg/ml als auch der mit PMA/IO stimulierten Zellen mit 85 pg/ml bis 95 pg/ml relativ konstant. Die Konzentration von IL-13 in Zellüberständen der mit den drei höheren Omalizumab Konzentrationen behandelten Zellen war zum Studieneinschluss im Vergleich zu den mit PMA/IO stimulierten Zellen deutlich erhöht. So konnte für die mit Omalizumab behandelten Zellen IL-13 Konzentrationen zwischen 80 pg/ml und 132 pg/ml gemessen werden. Nach drei Monaten lagen die IL-13 Konzentrationen mit Werten zwischen 87 pg/ml und 98 pg/ml wieder auf Höhe der mit PMA stimulierten Zellen (94 pg/ml). Das gleiche Bild ergab sich für die Messwerte nach sechs Monaten mit Konzentrationen zwischen 82 pg/ml und 88 pg/ml.

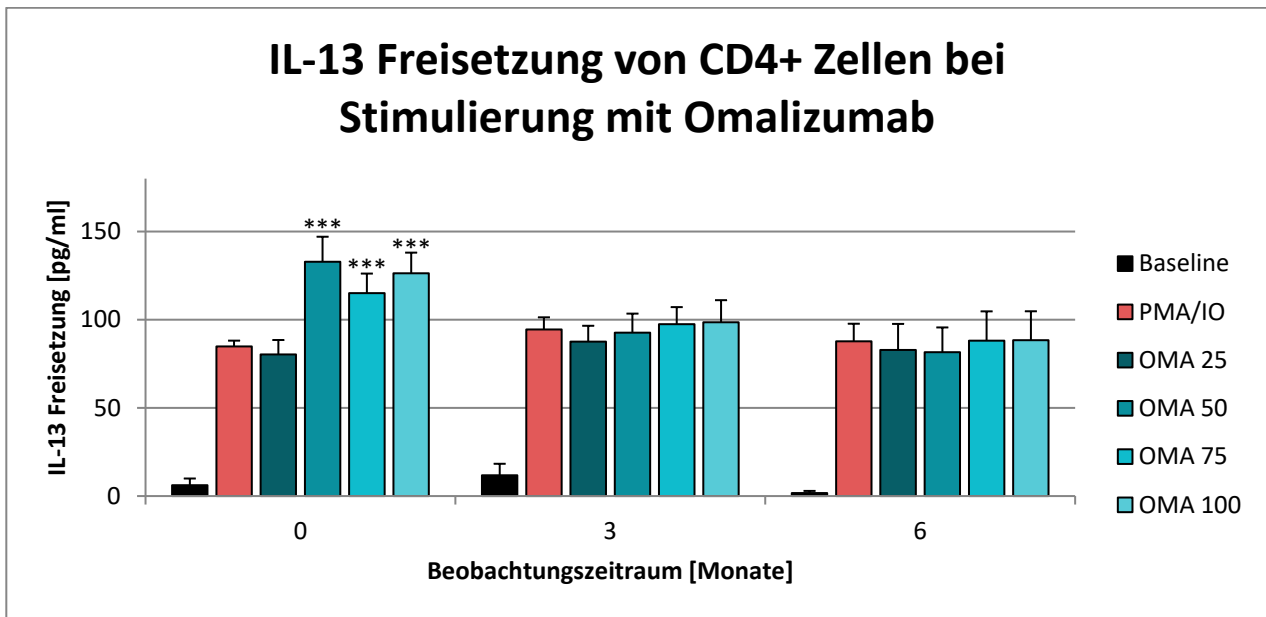


Abb. 10: IL-13 Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehaltener CD4+ Zellkulturen. Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Gemessenen IL-13 Freisetzung in pg/ml. Bei allen Säulen ist zusätzlich die Standardabweichung mit dargestellt (n=19). Signifikante Veränderungen der mit Omalizumab (OMA µg/ml) stimulierten Zellen zu den mit PMA/IO behandelten Zellen sind mit Sternchen (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001) gekennzeichnet. Abk. PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat, IO: Ionomycin

3.2.4 TNF- α Freisetzung

In Abbildung 11 sind die gemessenen TNF- α Konzentrationen der Zellüberstände von unstimulierten, stimulierten und mit verschiedenen Omalizumab Konzentrationen behandelten CD4⁺ Zellen zusammengefasst. Im Verlauf der sechsmonatigen Behandlung blieben die sezernierten TNF- α Mengen der unbehaltener Zellen relativ konstant zwischen 60 pg/ml 85 pg/ml. Die mit PMA/IO stimulierten Zellen hingegen lagen zum Studienbeginn mit einer TNF- α Konzentration von 776 pg/ml im Zellüberstand um mehr als den Faktor 10 über denen der Baseline (60 pg/ml). Nach drei Monaten sank der Wert der mit PMA/IO stimulierten Zellen leicht auf 699 pg/ml um anschließend nach sechs Monaten auf 827 pg/ml zu steigen. Bei den mit verschiedenen Omalizumab Konzentrationen behandelten Zellen konnte kein vergleichbarer Anstieg der TNF- α Sezernierung beobachtet werden. Zum Studienbeginn lagen die Werte zwischen 821 pg/ml und 1030 pg/ml und damit in etwa 13-17-fach so hoch wie die der unbehaltener Zellen (61 pg/ml). Nach drei Monaten wurden TNF- α Konzentrationen zwischen 718 pg/ml

und 808 pg/ml gemessen. Diese Werte sanken nach sechs Monaten leicht auf durchschnittlich 746 pg/ml für alle eingesetzten Omalizumab Konzentrationen.

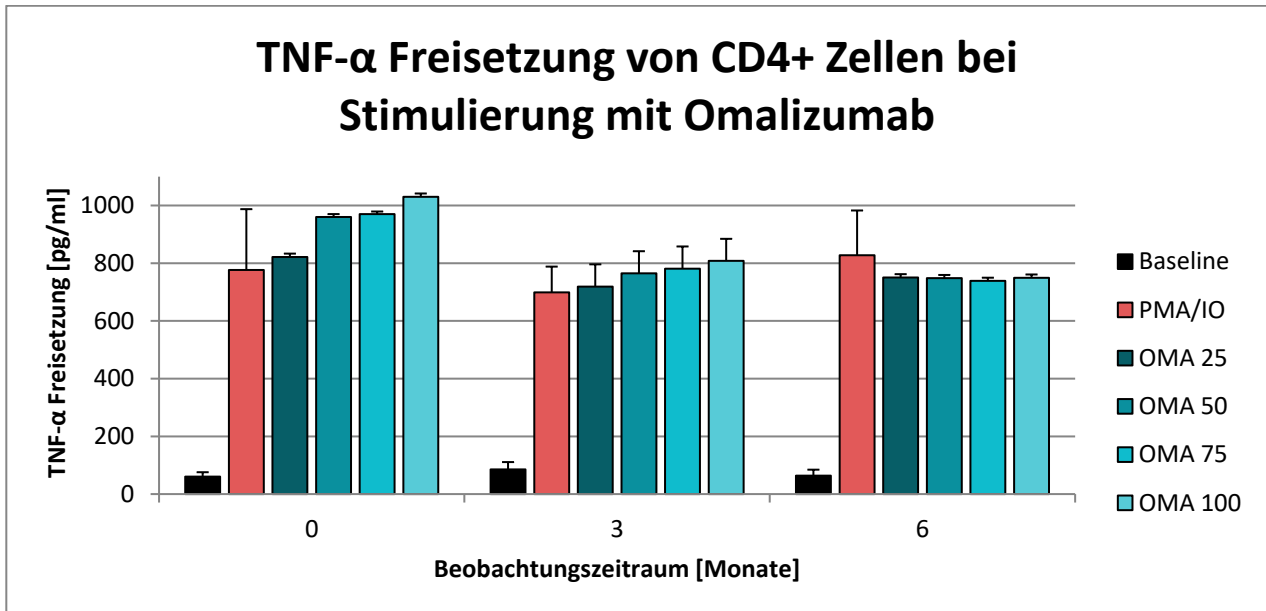


Abb. 11: TNF- α Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehandelter CD4+ Zellkulturen. Abszisse: Messung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, beim ersten Follow up (nach drei Monaten) und beim zweiten Follow up (nach sechs Monaten) Ordinate: Gemessenen TNF- α Freisetzung in pg/ml. Bei allen Säulen ist zusätzlich die Standardabweichung mit dargestellt (n=19). Signifikante Veränderungen der mit Omalizumab (OMA μ g/ml) stimulierten Zellen zu den mit PMA/IO behandelten Zellen sind mit Sternchen (*p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001) gekennzeichnet. Abk. PMA: **P**horbol-12-**m**yrystat-13-**a**ccetat, IO: Ionomycin

4. Diskussion

Asthma bronchiale zählt zu den häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit und ist mit einer insgesamt steigenden Prävalenz und mehr als 300 Millionen betroffenen Menschen aller Altersklassen eine Herausforderung für das Leben der Betroffenen, ihrer Angehörigen und zunehmend auch für die Gesundheitssysteme (Aumann *et.al.*, 2014). Asthma bronchiale zeichnet sich durch eine extreme Heterogenität der Symptome und der Schwere ihrer Ausprägung aus. Die Leitsymptome sind Atemnot, Giemen („Wheezing“), Brustenge, Husten mit und ohne Auswurf, sowie bronchiale Hyperreagibilität (GINA, 2020). Die individuelle Ausprägung dieser Symptome und die unterschiedlichen Reaktionen auf verschiedene Therapieansätze führten im Laufe der Zeit zu einer Unterscheidung verschiedener Asthmatypen und Untertypen (Heaney *et.al.*, 2021). Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich dabei auf die Patientengruppen mit schwerem allergischem Asthma.

Seit einigen Jahren gibt es mit modernen Biologicals neue, potenziell sehr wirkungsvolle und zeitgleich nebenwirkungsarme Therapieansätze für verschiedenste Krankheitsbilder (Chames *et.al.*, 2009). Zu diesen neuen Ansätzen gehören unter anderem Antikörpertherapien, die direkt in immunologische Vorgänge eingreifen und keine reine Symptombehandlung mehr darstellen. Antikörpertherapien können sich teilweise direkt gegen die zugrundeliegende Störung richten und so viel früher in die Pathogenese verschiedener Krankheiten eingreifen. In vielen Fachgebieten der Medizin wurden in den letzten Jahrzehnten mit antikörperbasierten Ansätzen bahnbrechende Erfolge erzielt. Die vorliegende Arbeit widmet sich Omalizumab, einem gegen IgE gerichteten Antikörper, der schon seit längerem bei der Asthmakontrolle von schwerem Asthma eingesetzt wird (Rogliani *et.al.*, 2020). Forschungsgegenstand war dabei der Einfluss von Omalizumab auf die Zytokinproduktion der Th₂-Helferzellen *in vitro* und ein Vergleich mit klinischen Verlaufsparemtern.

Um den Einfluss von Omalizumab auf isolierte Th₂-Helferzellen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden CD4⁺ Th₂-Helferzellen aus dem Blut der Patienten isoliert und *in vitro* Stimulationsversuche durchgeführt. Mit Hilfe von ELISAs wurden anschließend die

Konzentrationen von vier unterschiedlichen Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α) gemessen. Parallel zu der Antikörpertherapie wurden verschiedene klinische Parameter erhoben, um eine erwartete Verbesserung der Symptomatik über den Verlauf des Studienzeitraums zu dokumentieren. Dazu diente der standardisierte ACT, die Messung der FEV₁ und der exhalieren FeNO Konzentration.

4.1 Klinische Untersuchungen und Patientenbefragung

4.1.1 FEV₁

Aufgrund der Einfachheit der Testdurchführung und Interpretation der Ergebnisse wurden verschiedene Untersuchungen der Lungenkapazität (TLC) schon früh als diagnostisches Mittel herangezogen wie eine Metastudie aus dem Jahre 1991 zeigt (American Thoracic Society, 1991). Die forcierte Einsekundenkapazität hat sich dabei zu einer bewährten Methode bei der Verlaufskontrolle von Asthma bronchiale entwickelt und gilt seit langem als einer der wichtigsten klinischen Parameter zur Diagnostik einer Asthma Erkrankung (Woolcock und Read, 1966).

Während des Studienverlaufes hat sich die FEV₁ der Teilnehmer konstant verbessert und stieg von anfänglich 1910 ml im Durchschnitt auf 2380 ml an. Das entspricht einer Verbesserung von ca. 25 % in 6 Monaten (siehe Abb.5). Ältere Studien aus den letzten zwanzig Jahren haben meist einen geringeren Effekt von Omalizumab im Bereich von +2 % bis +5 % auf die FEV₁ beobachten können (Durrain *et.al.*, 2011), allerdings beschränkte sich die Zusammensetzung der Teilnehmer nicht auf Patienten mit schwerem allergischem Asthma. Diese Heterogenität der Teilnehmer (unter anderem Kinder) könnte zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben und resultiert in einer Unvergleichbarkeit der erhobenen Daten. Neuere Studien mit einer vergleichbaren Patientenzusammensetzung kommen auf ähnliche Werte wie in der vorliegenden Arbeit. So konnte Yalcin *et.al.* bei 10 schweren Asthmatikern nach einer 16-wöchigen Behandlung mit Omalizumab eine durchschnittliche Verbesserung der FEV₁ von 29 % (1700 ml auf 2200 ml) beobachten (Yalcin *et.al.*, 2016). In einer Gruppe von 15 schweren Asthmatikern mit einer zusätzlichen COPD Symptomatik (ACOS) verbesserte eine Omalizumab Therapie die FEV₁ nach einem Jahr um durchschnittlich 22 % (Pelaia *et.al.*,

2019). Da die FEV₁ maßgeblich durch die Verengung der Bronchien (siehe. 1.1 ff) bestimmt wird, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Verbesserung der Symptomatik auf eine Reduzierung der chronischen entzündlichen Vorgänge im Bronchialgewebe zurückzuführen ist.

4.1.2 FeNO

Das fraktionierte exhalierte Stickstoffmonoxid dient als Biomarker für entzündliche Reaktionen im Bronchialgewebe. Durch die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin entsteht ungebundenes gasförmiges Stickstoffmonoxid (NO) welches über die Lunge abgeatmet wird. Das Schlüsselenzym bei dieser Reaktion ist die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) deren Aktivität durch Histamine, Leukotrine und Acetylcholin hochreguliert wird (Forstermann *et.al.*, 1991). Da diese Mediatoren auch maßgeblich an entzündlichen Reaktionen beteiligt sind, lässt sich eine erhöhte NO Konzentration direkt auf eine vorhandene Entzündungsreaktion zurückführen (Riccardiolo *et.al.*, 2006). Dabei besteht eine direkte Korrelation zwischen der Höhe der gemessenen NO-Werte und dem Ausmaß der Entzündung. In einer großen Metastudie konnten Karrasch *et.al.* einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhten NO-Werten und einer Asthmadignose herstellen (Karrasch *et.al.*, 2017). Durch die leichte Durchführbarkeit und eindeutige Korrelation mit dem Ausmaß einer bestehenden Entzündung bot sich dieses diagnostische Verfahren für diese Arbeit an.

Im Verlauf dieser Studie sank der Anteil an NO in der ausgeatmeten Luft der Patienten um ca. 52 % (siehe Abb. 6). Das bestätigt eine oft nachgewiesene anti-inflammatorische Wirkung von Omalizumab im Bronchialgewebe (Sattler *et.al.*, 2017). Ein direkter Vergleich mit anderen Studien ist dadurch erschwert, dass die Patientengruppen oft deutlich heterogener waren und im Verlauf vieler Studien die parallel verabreichte ICS Dosis gesenkt wurde. Eine Studie mit 10 von ACOS betroffenen Patienten konnte im Verlauf von 12 Monaten nur eine deutlich geringere Abnahme von 25 % beobachten (Yalcin *et.al.*, 2016). Allerdings lagen die Ausgangswerte deutlich höher (80 ppb) und 9 von 10 Patienten waren Raucher, was unabhängig von entzündlichen Reaktionen zu einem erhöhten NO-Wert führen kann (Robbins *et.al.*, 1997). In einer Studie mit 29 Kindern

zwischen 6 und 12 Jahren konnte über einen Zeitraum von 52 Wochen eine Reduktion des FeNO um ca. 57 % bei gleichzeitiger ICS Reduzierung beobachtet werden. Die Ausgangswerte lagen mit 42 ppb dabei auf einem vergleichbaren Niveau (Silkoff *et.al.*, 2004). Wie schon die Ergebnisse aus 4.2.1 nahelegen, konnte auch mit der FeNO-Messung eine Reduzierung der entzündlichen Reaktionen im Lungengewebe im Verlauf der Omalizumab Therapie nachgewiesen werden.

4.1.3 ACT (Asthma Control Test)

Der „Asthma Control Test“ wurde 2004 anhand der GINA und NAEPP (**N**ational **A**sthma **E**ducation and **P**revention **P**rogram) Richtlinien entwickelt. 471 Asthmapatienten mit unkontrolliertem Asthma wurden dazu mit einem Fragenkatalog mit 22 Fragen zu ihren Beschwerden interviewt. Anschließend wurden mit Hilfe statistischer Methoden fünf Kernfragen isoliert, die mit den klinischen Parametern am besten korrelierten (Nathan *et.al.*, 2004). Der ACT hat sich in den letzten Jahren zur Erfassung der Asthmakontrolle durch Patientenbefragung bewährt (Jia *et.al.*, 2013). Durch den überschaubaren Bearbeitungsaufwand und die leichte Auswertung des ACT bot sich diese Art der Befragung für die in dieser Arbeit behandelte Patientengruppe an.

Zum Studieneinschluss ergab die Auswertung (siehe Abb. 7) einen durchschnittlichen Wert von 14,7 Punkten was gemäß der aktualisierten Punkteskala von 2017 ein „unkontrolliertes Asthma“ bedeutet ($x \leq 15$). Nach sechs Monaten lag der Punktwert durchschnittlich bei 20 was eine Steigerung um +36 % (5.3 Punkte) bedeutet und im unteren Bereich der besten Kategorie „Kontrolliertes Asthma“ (20-25 Punkte) liegt. Diese Werte passen gut zu den in 4.1.1 und 4.1.2 besprochenen Daten und zeigen neben einer deutlichen Verbesserung der klinischen Werte auch eine starke Verbesserung des subjektiven Empfindens der Patienten durch eine Omalizumab Therapie. Dazu passt auch die von Senna *et.al.* festgestellte starke Korrelation zwischen einem Abfallen der FeNO-Werte und einer positiven Entwicklung im ACT (Senna *et.al.*, 2007). Auch hier ist ein Vergleich mit den meisten anderen Omalizumab-Studien aufgrund der Patientenzusammensetzung oder des Studienaufbaus unzulässig. Jedoch kommen Pelaia *et.al.* in einer vergleichbaren Studie (s.o.) mit 15 Asthma Patienten nach 12

Monaten auf fast identische Werte (14.6 – 19.2). Und auch bei Yalcin *et.al.* verbesserten sich die Werte nach einem Jahr durchschnittlich um 6.3 Punkte (Yalcin *et.al.*, 2016). Laut Hersteller kann es 12-16 Wochen dauern, bis sich die volle Wirkung von Xolair® einstellt (Gebrauchsinformation für Anwender, Novartis 10/2021). Die positive Entwicklung vom Studienbeginn bis zum ersten Follow up nach 3 Monaten (+2.9 Punkte) könnte durch den Hawthorne-Effekt unterstützt bzw. verfälscht worden sein (Adair, 1984). Dafür würden die Daten des FeNO sprechen, die in den ersten drei Monaten nur schwach fallen (siehe 3.1.2). Gegen eine starke Verzerrung der Daten spricht allerdings die schon frühe deutliche Verbesserung der FEV₁, die für das subjektive Empfinden der Patienten deutlich wichtiger (da spürbar) sein dürfte als die FeNO-Werte.

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

4.2.1 IL-4

Die ex vivo Stimulationsversuche mit isolierten CD4⁺Th₂-Zellen ergaben kein schlüssiges Bild und legen im Vergleich zu anderen Studien nahe, dass Stimulationsversuche ex vivo keine brauchbaren Daten im Zusammenhang mit Omalizumab generieren. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, funktioniert die Stimulation mit PMA/IO. Unstimulierte Zellen (schwarze Balken) sezernierten zwischen 10 pg/ml und 20 pg/ml IL-4. Bei stimulierten Zellen (rote Balken) konnten um den Faktor 16-fach höhere Konzentrationen an IL-4 im Überstand der Zellen ermittelt werden. Zum Studieneinschluss konnten bei OMA 25 signifikant und bei OMA 75 sehr signifikant niedrigere Messwerte als bei der reinen Stimulation mit PMA/IO gemessen werden (blaue Balken). Aufgrund der hohen Standardabweichung der Messungen ist dieses Ergebnis nicht eindeutig interpretierbar. Warum ist bei OMA 25 und OMA 75 eine Signifikanz messbar, bei OMA 50 und OMA 100 jedoch nicht?

Vielmehr erhärtet die Messung die Vermutung, dass die Reaktion auf eine Stimulation der Zellen von allen eingesetzten Omalizumab Konzentrationen unbeeinflusst war. Wie Ai *et.al.* anmerken ist eine Stimulation von isolierten Zellen ex vivo schwierig, da viele Faktoren aus dem Blut fehlen könnten, die Einfluss auf eine Aktivierung haben (Ai *et.al.*, 2013). Omalizumab fängt freie IgE Antikörper ab und verhindert dadurch eine mögliche

Aktivierung der Th₂-Zellen. Da in den Zellüberständen der isolierten Zellen kein IgE vorhanden ist, kann Omalizumab auch keinen Einfluss auf die Aktivierung und anschließende Ausschüttung von Zytokinen haben.

Die Messung der IL-4 Konzentration im Blutserum derselben Patientengruppe ergab eine Abnahme der Konzentration (Ulrich-Merzenich *et.al.*; 2019). In einer anderen Studie konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion der IL-4 Konzentration im Blutserum nachgewiesen werden (Yalcin *et.al.*, 2016). Die Beobachtung der gesteigerten Stimulationsfähigkeit steht konträr zu der Annahme, dass eine Omalizumab Therapie die Aktivierungsfähigkeit der Th₂-Zellen herabsetzt. Durch die sechsmonatige Therapie sollte es zu einer Reduktion des freien IgE kommen und dadurch auch zu einer reduzierten Expression der FcεRI-Rezeptoren auf Th₂-Zellen (Chang, 2000).

4.2.2 IL-5

Bei IL-5 verhält es sich ähnlich wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Die Stimulation der Zellen war erfolgreich, wie der Vergleich zwischen den stimulierten (rote Balken) und den unstimulierten Zellen (schwarze Balken) zeigt (Abb.9). Jedoch ist sowohl zum Studieneinschluss als auch nach drei Monaten ein Unterschied zwischen stimulierten und stimulierten plus mit Omalizumab behandelten Zellen festzustellen (blaue Balken). Sowohl bei OMA 75 als auch bei OMA 100 sind nach drei Monaten sehr signifikant größere Werte gemessen worden im Verhältnis zur Stimulation mit PMA/IO. Zum Studieneinschluss war nur bei OMA 100 der gemessene Wert sehr signifikant niedriger als bei der reinen Stimulation mit PMA/IO. Genauso wie bei der IL-4 Messung sind die gemessenen Signifikanzen schwer interpretierbar und finden in der Literatur keine Analogie.

Aus den oben genannten Gründen ist der nach sechs Monaten zu beobachtende Effekt nicht zu erklären. Allerdings konnte eine Abnahme der Stimulationsfähigkeit über den Studienverlauf festgestellt werden, was möglicherweise durch den in 4.2.1 erwähnten Effekt, der verringerten Rezeptoranzahl, zu erklären ist (Chang, 2000). Auch in diesem Fall konnte bei derselben Patientengruppe eine Abnahme von IL-5 im Blutserum nachgewiesen werden (Ulrich-Merzenich *et.al.*, 2019). Zusätzlich kam es in anderen

Studien während einer Omalizumab Therapie zu einer Abnahme von IL-5 im Serum (Noga *et.al.*, 2003).

4.2.3 IL-13

Die ex vivo Stimulationsversuche und anschließenden Konzentrationsbestimmungen von IL-13 ergaben ein ähnliches Bild wie bei IL-4 und IL-5. Die Stimulation der Zellen war erfolgreich, die Konzentration von IL-13 im Überstand von stimulierten Zellen (rote Balken) lag um den Faktor acht bis zehn über denen der unstimulierten Zellen (schwarze Balken) (Abb.10). Die anfänglich zum Teil hoch signifikant erhöhten Werte der mit Omalizumab behandelten Zellen lassen sich nur schwer interpretieren und finden in der Literatur ebenfalls keine Analogie. Nach drei und sechs Monaten ist kein signifikanter Unterschied in der IL-13 Ausschüttung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festzustellen. Omalizumab hatte im Durchschnitt keinen Einfluss auf die IL-13 Konzentration im Blutserum in diesem Patientenkollektiv. Möglich ist jedoch, dass Patienten, die endotypenabhängig wenig auf Omalizumab reagieren, von einer Antikörpertherapie gegen IL-13 profitieren könnten (Ulrich-Merzenich *et.al.*, 2019).

4.2.4 TNF- α

Die Stimulation der Zellen war erfolgreich und führte im Vergleich zu den anderen oben beschriebenen Zytokinen zu einer sehr hohen Ausschüttung von TNF- α (Abb.11). Die Zugabe von Omalizumab führte zu einer nicht signifikanten Hemmung der TNF- α Produktion im Verlauf der sechsmonatigen Therapie. Das Niveau der Stimulierbarkeit der Zellen änderte sich über den Verlauf der Studie nicht. Dies indiziert, dass Omalizumab in vivo kaum einen Effekt auf die Sezernierung von TNF- α durch Th₂-Zellen hat. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Dosisunabhängigkeit dieses Effektes.

In einer vergleichbaren Studie konnte eine geringe Zunahme von TNF- α nach einer Omalizumab Therapie im Blutserum beobachtet werden. Diese lag aber im Rahmen der statistischen Abweichung und führte von den Studienautoren zu der Aussage, dass sich die TNF- α Konzentration nicht bedeutend verändert hätte (Yalcin *et.al.*, 2016). Im

Gegensatz dazu konnten wir in unserer Studienpopulation eine Abnahme der TNF- α Serumkonzentrationen beobachten (Ulrich-Merzenich *et.al.*, 2019).

Gemeinhin wird TNF- α auch als sehr unspezifischer Marker für Entzündungsreaktionen beschrieben und trotzdem könnte TNF- α bei bestimmten Patienten mit Th₁ vermittelter Immunreaktion einen Ansatzpunkt für eine Asthatherapie darstellen (Brightling *et.al.*, 2008). Eine klinische, doppelblinde und Plazebo kontrollierte Studie mit dem humanen monoklonalen Antikörper gegen TNF- α Golimumab zeigte jedoch keine klinisch signifikante Verbesserung der Symptomatik bei Patienten mit schwerem unkontrolliertem Asthma. Die Patienten (n=309; Randomisierung 1:1) waren über 52 Wochen behandelt worden (Wenzel et al 2009). Dies spricht dafür, dass TNF- α für Asthma ein unspezifischer Entzündungsmarker ist und seine Hemmung den Krankheitsverlauf nicht maßgeblich verändert. Folgestudien zur Behandlung von schwerem Asthma mit einem anderen TNF- α Antikörper wurden bisher nicht durchgeführt. Jedoch zeigte die Hemmung von IL-33 bzw. der ST2 Achse durch Astegolimab (Anti-ST2) in einer kürzlich veröffentlichten randomisierten Studie, in der insgesamt 502 Patienten mit schwerem Asthma untersucht wurden, sehr vielversprechende Ergebnisse (Kelsen et al. 2021). Eine weitere randomisierte Placebo kontrollierte multizentrische Studie (Phase II A), in der Patienten mit moderatem bis schwerem unkontrolliertem Asthma (Verum n=54; Placebo n=45) mit einem humanen Antikörper, der sich gegen den IL-33 Rezeptor (GSK3772847) richtet, behandelt wurden, kam zum Schluss, dass diese Behandlung für Patienten mit unkontrolliertem Asthma von Nutzen sein könnte, aber weitere Studien nötig und gerechtfertigt sind (Crim et al. 2022). Eine kürzlich im European Respiratory Journal veröffentlichte Studie aus Deutschland schlussfolgerte, dass bei Patienten mit schwerem Asthma eine gezielte Behandlung mit einem anti-IL-33R eine potenzielle neue Behandlungsoption sein könnte, unabhängig von T2-Markern (Abdo M et al. 2024). In der vorliegenden Studie wurde bei den Patienten die Genexpression von IL-33 unter Omalizumab-Therapie untersucht. Dies jedoch war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

5. Zusammenfassung

Asthma bronchiale zählt mit mehr als 300 Millionen Betroffenen Patienten weltweit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen und zeichnet sich durch das Auftreten verschiedener Leitsymptome, wie Atemnot, Giemen, Brustenge, sowie durch eine bronchiale Hyperreagibilität aus. Diesen, in ihrer Intensität und Kombination stark variierenden Symptomatiken, liegt eine chronische Entzündung des Bronchialgewebes zugrunde. Die verschiedenen Trigger, die individuelle Ausprägung dieser Symptome und die unterschiedlichen Reaktionen auf verschiedene Therapieansätze führten im Laufe der Zeit zu einer komplexen Unterscheidung verschiedener Asthmatypen und Untertypen. Neue molekularbiologische Erkenntnisse der Pathophysiologie dieses Krankheitskomplexes unterstützen die Differenzierung in verschiedene Patientengruppen und eröffnen die Möglichkeit eines individualisierten Therapieansatzes mit verbesserten Behandlungserfolgen und geringeren ökonomischen Gesamtkosten.

Im Fokus dieser Arbeit lag die Behandlung einer Patientengruppe (n=19) atopischer schwerer Asthmatiker mit einem immunmodulierenden Antikörper (Omalizumab/Xolair®) über einen Zeitraum von sechs Monaten. Durch den Vergleich klinischer Patientendaten und den gewonnenen Daten von *ex vivo* Stimulationsversuchen mit von Patienten isolierten Th₂-Zellen, sollte ein immunbiologischer Zusammenhang zwischen Omalizumab -Therapie und einer Verbesserung der klinischen Symptomatik genauer untersucht werden. Dies könnte in Zukunft dabei helfen, Patientengruppen mit verschiedenen Phäno- und Endotypen vorab zu charakterisieren und so eine Therapieentscheidung, auch im Hinblick auf neue therapeutische Antikörper, zu erleichtern.

Die gewonnenen klinischen Daten zeigen eine deutliche Verbesserung, sowohl der Funktionsleistung der Lunge, als auch einen Rückgang der entzündlichen Reaktionen im Bronchialgewebe unter Omalizumab -Therapie. Diese klinischen Daten spiegeln sich in den Ergebnissen des zeitgleich durchgeführten Asthma-Kontroll-Tests (ACT) wieder und entsprechen Ergebnissen vergleichbarer Studien. Die *ex vivo* Stimulationsversuche mit isolierten Th₂-Zellpopulationen hingegen können mit der durchgeführten Methodik nicht zu einem verbesserten Verständnis der Pathophysiologie oder zu einer genaueren Klassifizierung von Patienten beitragen und eine damit verbundene verbesserte Auswahl der Therapieoptionen unterstützen. Dennoch sollte in Zukunft, in Hinsicht auf eine genauere Identifizierung von Patientensubgruppen die Möglichkeit molekularbiologischer *ex vivo* Diagnostik, die dem komplexen Immungeschehen gerechter wird, in Betracht gezogen werden.

6. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|------|
| Abbildung 1: | Asthma-Stufenschema 2024 (AWMF online, 2024) | S.12 |
| Abbildung 2: | Immunologische Reaktionskaskade einer allergischen Reaktion (Gould und Sutton, 2008) | S.21 |
| Abbildung 3: | Schematische Darstellung der MACS-Methode | S.32 |
| Abbildung 4: | Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Sandwich ELISA | S.34 |
| Abbildung 5: | Durchschnittliche forcierte Einsekundenkapazität (FEV1) | S.38 |
| Abbildung 6: | Fraktioniertes exhalierendes Stickstoffmonoxid (FeNO) | S.39 |
| Abbildung 7: | Ergebnisse des Asthma control Test (ACT) | S.40 |
| Abbildung 8: | IL-4 Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehandelter CD4+ Zellkulturen | S.41 |
| Abbildung 9: | IL-5 Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehandelter CD4+ Zellkulturen | S.43 |
| Abbildung 10: | IL-13 Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehandelter CD4+ Zellkulturen | S.44 |
| Abbildung 11: | TNF- α Konzentration in Zellüberständen behandelter und unbehandelter CD4+ Zellkulturen | S.45 |

7. Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|------------------|------|
| Tabelle 1: | qRT-PCR Programm | S.36 |
| Tabelle 2: | TaqMan®-Primer | S.36 |

8. Literaturverzeichnis

- Aaron, S. D., Vandemheen, K. L., Boulet, L.-P., McIvor, R. A., FitzGerald, J. M., Hernandez, P. et al. 2008. Overdiagnosis of asthma in obese and nonobese adults. *Canadian Medical Association Journal*, 179
- Abdel-Aziz, H., Schneider, M., Neuhuber, W., Kassem, A. M., Khailah, S., Müller, J. et al. 2015. GPR84 and TREM-1 Signaling Contribute to the Pathogenesis of Reflux Esophagitis. *Molecular Medicine*, 21, 1011–1024
- Abdo M, Pedersen F, Kirsten AM, Trinkmann F, Groth EE, Bahmer T, Watz H, Rabe KF. Association of airway inflammation and smoking status with IL-33 level in sputum of patients with asthma or COPD
Eur Respir J. 2024 Aug 15. doi:10.1183/13993003.00347-2024
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L. & Chen, H. 2013. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*
- American Thoracic Society 1991. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis*, 144, 1202-1218
- Anderson, G. P. 2008. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet*, 372 9643, 1107–1119
- NVL Asthma – Langfassung, 4. Auflage 2018. Bundesärztekammer BÄK; Kassenärztliche Bundesvereinigung KBV; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften AWMF
- Aumann, I., Prenzler, A., Welte, T. & Gillissen, A. 2014. Epidemiologie und Kosten von Asthma bronchiale in Deutschland – eine systematische Literaturrecherche. *Pneumologie*, 68, 557–567
- Babu, K. S. & Salvi, S. S. 2000. Aspirin and Asthma. *Chest*, 118, 1470–1476
- Beasley, R., Crane, J. & Lai, C. K. W. 2000. Epidemiology and genetics of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, 7.

- Bennich, H. H. & Ishizaka, K. o. J. Immunoglobulin E, a new class of Human Immunglobulin. *Immunology*, 1968, 323
- Berenguer, A., Fernandes, A., Oliveira, S., Rodrigues, M., Ornelas, P., Romeira, D. et al. 2014. Genetic polymorphisms and asthma: findings from a case–control study in the Madeira island population. *Biological Research*, 47, 40
- Bergmann, K.-C., Skowasch, D., Timmermann, H., Lindner, R., Virchow, J. C., Schmidt, O. et al. 2022. Prevalence of Patients with Uncontrolled Asthma Despite NVL/GINA Step 4/5 Treatment in Germany. *Journal of Asthma and Allergy*, Volume 15, 897–906
- Berry, M., Brightling, C., Pavord, I. & Wardlaw, A. 2007. TNF- α in asthma. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 279–282
- Braun-Fahrländer, C., Waser, M., Grize, L., Bufe, A. & Nowak, D. 2002. Environmental Exposure to Endotoxin and Its Relation to Asthma in School-Age Children. *The New England Journal of Medicine*, 9
- Brightling, C., Berry, M. & Amrani, Y. 2008. Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 5–10
- Bröker, B. & Schütt, B. 2009. *Grundwissen Immunologie*. Springer 2009
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J. C. & Tonnel, A. B. 1986. From parasites to allergy: a second receptor for IgE. *Immunology Today*, 7, 15–18
- Casale, T. B., Wood, D., Richerson, H. B., Zehr, B., Zavala, D. & Hunninghake, G. W. 1987. Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *Journal of Clinical Investigation*, 80
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future: Therapeutic antibodies: an update. *British Journal of Pharmacology*, 157
- Chang, T. W. 2000. The pharmacological basis of anti-IgE therapy. *Nature Biotechnology*, 18
- Charriot, J., Vachier, I., Halimi, L., Gamez, A.-S., Boissin, C., Salama, M. et al. 2016. Future treatment for asthma. *European Respiratory Review*, 25, 77–92

- Chatila, T. A. 2004. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 10, 493–499
- Coward, W. R., Okayama, Y., Sagara, H., Wilson, S. J., Holgate, S. T. & Church, M. K. 2002. NF- κ B and TNF- α : A Positive Autocrine Loop in Human Lung Mast Cells? *The Journal of Immunology*, 169, 5287–5293
- Crim C, Stone S, Millar V, Lettis S, Bel EH, Menzies-Gow A, Chanez P, Wenzel S, Lugogo N, Bleecker ER. IL-33 receptor inhibition in subjects with uncontrolled asthma: A randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol Glob*. 2022 Aug 17;14:198-208. doi: 10.1016/j.jacig.2022.07.002. PMID: 37779541; PMCID: PMC10509964.
- Dougherty, R. H. & Fahy, J. V. 2009. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 193–202
- Durrani, S. R., Viswanathan, R. K. & Busse, W. W. 2011. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128, 439–448
- Elias, J. A., Zhu, Z., Chupp, G. & Homer, R. J. 1999. Airway remodeling in asthma. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 1001–1006
- Farne, H. A., Wilson, A., Bax, L. & Milan, S. J. 2017. Anti-IL5 therapies for asthma. *Cochrane Airways Group, Hrsg., Cochrane Database of Systematic Reviews*
- Forstermann, U., Sheng, H., Mitchell, J. A., Murad, F., Laboratories, A. & Park, A. o. J.. *Commetary Isoforms Of Nitric Oxide Synthase*, 9
- Galli, S. J. & Tsai, M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 18, 693–704.
- GINA Report 2018. ginasthma.org
- GINA Report 2020. ginasthma.org
- Gould, H. J. & Sutton, B. J. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*, 8, 205–217

- Gould, H. J., Sutton, B. J., Beavil, A. J., Beavil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A. et al. 2003. The Biology of IgE and the Basis of Allergic Disease. *Annual Review of Immunology*, 21, 579–628
- Hackl, C., Milger-Kneidinger, K. 2023. Schweres Asthma – wann, wen und wie therapieren? *Kompodium Pneumologie 2023*; 8-16
- Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. T. 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 325–338
- Hansen, G. 2001. Das Th1/Th2-Paradigma bei allergischen Asthma bronchiale. *Monatsschr Kinderheilkd* 149, 112–119
- Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridge, R. 2010. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs*, 2, 256–265
- Heaney, L. G., Perez de Llano, L., Al-Ahmad, M., Backer, V., Busby, J., Canonica, G. W. et al. 2021. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma. *Chest*, 160, 814–830
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115, 1–20
- Humbert, M., Busse, W., Hanania, N. A., Lowe, P. J., Canvin, J., Erpenbeck, V. J. et al. 2014. Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2, 525-536.e1
- Humbert, M., Corrigan, C. J., Kimmitt, P., Till, S. J., Barry Kay, A. & Durham, S. R. 1997. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA Expression and Disease Severity in Atopic Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156, 704–708
- Janeway, C. 2001. *Immunobiology 5th edition*. Springer 2001
- Jia, C. E., Zhang, H. P., Lv, Y., Liang, R., Jiang, Y. Q., Powell, H. et al. 2013. The Asthma Control Test and Asthma Control Questionnaire for assessing asthma control: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 695–703

- Karrasch, S., Linde, K., Rücker, G., Sommer, H., Karsch-Völk, M., Kleijnen, J. et al. 2017. Accuracy of FE NO for diagnosing asthma: a systematic review. *Thorax*, 72, 109–116
- Kinyanjui, M. W., Shan, J., Nakada, E. M., Qureshi, S. T. & Fixman, E. D. 2013. Dose-Dependent Effects of IL-17 on IL-13–Induced Airway Inflammatory Responses and Airway Hyperresponsiveness. *The Journal of Immunology*, 190, 3859–3868
- Klimek, L. & Förster-Ruhrmann, U. 2021. Positionspapier: Empfehlungen zur Anwendung von Omalizumab bei chronischer Rhinosinusitis mit Polyposis nasi (CRSwNP) im deutschen Gesundheitssystem
- Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497, 1975
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. Yijuan, Kiss, R. & Amanullah, A. 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2, 466–479
- Liu, J. K. H. 2014. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3, 113–116
- Lloyd, C. M. & Hessel, E. M. 2010. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nature Reviews Immunology*, 10, 838–848
- Lo, A. S.-Y., Zhu, Q. & Marasco, W. A. 2008. Intracellular Antibodies Intrabodies and Their Therapeutic Potential *Handbook of Experimental Pharmacology*. In Y. Chernajovsky & A. Nissim Hrsg., *Therapeutic Antibodies*, Band 181, S. 343–373. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2008
- Lopez, A. F., Begley, C. G., Williamson, D. J., Warren, D. J., Vadas, M. A. & Sanderson, C. J. 1986. Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *Journal of Experimental Medicine*, 163, 1085–1099
- Lukacs, N., Stricter, R. & Chensue, S. 1995. 'TNF- α Mediates Recruitment of Neutrophils and Eosinophils During Airway Inflammation', 1576–1581.
- Lundbäck, B., Backman, H., Lötvall, J. & Rönmark, E. 2016. Is asthma prevalence still increasing? *Expert Review of Respiratory Medicine*, 10, 39–51

- Mattes, J., Yang, M., Siqueira, A., Clark, K., MacKenzie, J., McKenzie, A. N. J. et al. 2001. IL-13 Induces Airways Hyperreactivity Independently of the IL-4R α Chain in the Allergic Lung. *The Journal of Immunology*, 167, 1683–1692
- Miller, R.A., Maloney, D.G., Warnke, R., Levy, R., 1982. Treatment of B-Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody. March 4, 1982 *N Engl J Med* 1982; 306:517-522
- Mutschler, E. 2008. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2008
- Nathan, R. A., Sorkness, C. A., Kosinski, M., Schatz, M., Li, J. T., Marcus, P. et al. 2004. Development of the asthma control test☆A survey for assessing asthma control. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 59–65
- Noga, O., Hanf, G. & Kunkel, G. 2003. Immunological and Clinical Changes in Allergic Asthmatics following Treatment with Omalizumab. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131, 46–52
- Overveld, F. J., Jorens, Ph. G., Rampart, M., Backer, W. & Vermeire, P. A. 1991. Tumour necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and tryptase. *Clinical Experimental Allergy*, 21, 711–714
- Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J. & Kreitman, R. J. 2007. Immunotoxin Treatment of Cancer. *Annual Review of Medicine*, 58, 221–237
- Pelaia, C., Paoletti, G., Puggioni, F., Racca, F., Pelaia, G., Canonica, G. W. et al. 2019. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Frontiers in Physiology*, 10, 1514
- Pijnenburg, M. W. 2019. The Role of FeNO in Predicting Asthma. *Frontiers in Pediatrics*, 7, 41
- Pijnenburg, M. W. H. & De Jongste, J. C. 2007. Exhaled nitric oxide in childhood asthma: a review: Exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 38, 246–259
- Platts-Mills, T. A. E. 2001. The Role of Immunoglobulin E in Allergy and Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, S1–S5

- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G. et al. 1993. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90
- Ricciardolo, F. L. M., Di Stefano, A., Sabatini, F. & Folkerts, G. 2006. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *European Journal of Pharmacology*, 533 1–3, 240–252
- Robbins, R. A., Millatmal, T., Lassi, K., Rennard, S. & Daughton, D. 1997. Smoking Cessation Is Associated With an Increase in Exhaled Nitric Oxide. *Chest*, 112, 313–318
- Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, Tsicopoulos, S. A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham S.R., Kay, A.B. 1992 Predominant TH2-LIKE bronchoalveolar lymphocyte-t population in atopic asthma *N. Engl. J. Med.*, 326 1992, pp. 298-304
- Rogliani, P., Calzetta, L., Matera, M. G., Laitano, R., Ritondo, B. L., Hanania, N. A. et al. 2020. Severe Asthma and Biological Therapy: When, Which, and for Whom. *Pulmonary Therapy*, 6, 47–66
- Romanet-Manent, S., Charpin, D., Magnan, A., Lanteaume, A., Vervloet, D., & and the EGEA Cooperative Group. 2002. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy*, 57, 607–613
- Sattler, C., Garcia, G. & Humbert, M. 2017. Novel targets of omalizumab in asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23, 56–61
- Saunders, K. 1993. Origin of the word „asthma“. *Thorax*, 48, 647–647
- Schatz, M. & Rosenwasser, L. 2014. The Allergic Asthma Phenotype. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2, 645–648
- Scherzer, R. & Grayson, M. H. 2018. Heterogeneity and the origins of asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 121, 400–405
- P Scheurich, B Thoma, U Ucer, K Pfizenmaier; Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor TNF-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses.. *Journal of Immunology* 15 March 1987; 138: 1786–1790
- Sears, M. R. 2014. Trends in the Prevalence of Asthma. *Chest*, 145, 219–225

- Senna, G., Passalacqua, G., Schiappoli, M., Lombardi, C. & Wilcock, L. 2007. Correlation among FEV₁, nitric oxide and asthma control test in newly diagnosed asthma. *Allergy*, 62
- Shahhosseini, S., Das, D., Qiu, X., Feldmann, H., Jones, S. M. & Suresh, M. R. 2007. Production and characterization of monoclonal antibodies against different epitopes of Ebola virus antigens. *Journal of Virological Methods*, 143, 29–37
- Silkoff, P. E., Romero, F. A., Gupta, N., Townley, R. G. & Milgrom, H. 2004. Exhaled Nitric Oxide in Children With Asthma Receiving Xolair Omalizumab, a Monoclonal Anti-Immunoglobulin E Antibody. *Pediatrics*, 113, e308–e312
- Simon, H.-U. & Blaser, K. 1999. Immunologische Grundlagen des Asthma bronchiale. *Der Internist*, 40, 849–854
- Singh, S., Kumar, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P. et al. 2018. Monoclonal Antibodies: A Review. *Current Clinical Pharmacology*, 13, 85–99
- Slavin, R. G., Ferioli, C., Tannenbaum, S. J., Martin, C., Blogg, M. & Lowe, P. J. 2009. Asthma symptom re-emergence after omalizumab withdrawal correlates well with increasing IgE and decreasing pharmacokinetic concentrations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 107-113.e3
- A Slungaard, G M Vercellotti, G Walker, R D Nelson, H S Jacob; Tumor necrosis factor alpha/cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium.. *J Exp Med* 1 June 1990; 171: 2025–2041
- Smith, R. A. & Baglioni, C. 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 6951–6954
- Stanworth, D. R. 1993. The discovery of IgE. *Allergy*, 48, 67–71
- Starzl, T. E. & Fung, J. J. 2010. ORTHOCLONE OKT3 in Treatment of Allografts Rejected Under Cyclosporine-Steroid Therapy.
- Statistische Bundesamt Hrsg. Destatis.de
- Stephuhn, H., Kuhnert, R. & Scheidt-Nave, C. 2017. 12-Monats-Prävalenz von Asthma bronchiale bei Erwachsenen in Deutschland. RKI.de

- Szczeklik, A. & Stevenson, D. D. 2003. Aspirin-induced asthma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 913–921
- Thorburn, A. N., McKenzie, C. I., Shen, S., Stanley, D., Macia, L., Mason, L. J. et al. 2015. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications*, 6, 7320
- Vetrano, A. 2017. Asthma bronchiale – den akuten Asthmaanfall erkennen und im Notfall behandeln. *retten!* 2017; 6: 286-296
- Wenzel, S. 2012. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clinical & Experimental Allergy*, 42, 650–658
- Woolcock, A. J. & Read, J. 1966. Lung volumes in exacerbations of asthma. *The American Journal of Medicine*, 41, 259–273
- Yalcin, A. D., Celik, B. & Yalcin, A. N. 2016. Omalizumab anti-IgE therapy in the asthma–COPD overlap syndrome ACOS and its effects on circulating cytokine levels. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38, 253–256
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G. & van Ree, R. 2002. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science*, 296, 5567, 490–494
- Ying, S., Robinson, D. S., Varney, V., Meng, Q., Tsiopoulos, A., Moqbel, R. et al. 1991. TNFalpha mRNA expression in allergic inflammation. *Clinical Experimental Allergy*, 21, 745–750
- Zheng, Y. & Shopes, B. o. J. Conformations of IgE Bound to Its Receptor FcεRI and in Solution. *Biochemistry* 1991 30, 9125-9132

9. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der medizinischen Klinik II/III der Uniklinik Bonn durchgeführt. Die körperliche Untersuchung, die Bodyplethysmographie und die Blutentnahme der Probanden erfolgte in der pulmologischen Ambulanz der Uniklinik Bonn. Durchgeführt wurden diese teilweise durch das medizinische Personal vor Ort , sowie von mir und einem weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe, Andreas Tüschen.

Die Betreuung und Konzeption der Studie erfolgte durch meine Doktormutter [Gudrun Ulrich-Merzenich] und meinen Doktorvater [Uwe Juergens] in Zusammenarbeit mit Novartis. Bei der Konzeption wurden bereits Fragestellungen definiert, die von möglichen Doktoranden künftig durchgeführt werden sollen.

Sämtliche Laborversuche, deren Ergebnisse in meiner Dissertation dargestellt sind, wurden von mir nach Einarbeitung durch meine Doktormutter, sowie durch den Doktoranden Andreas Tüschen selbständig durchgeführt und ausgewertet.

Die Blutanalysen wurden vom Zentrallabor der Uniklinik Bonn durchgeführt.

Chat GPT oder andere KI-Anwendungen fanden keinen Einsatz in meiner Doktorarbeit.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) durch mich.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Veröffentlichungen

Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

ESR International Congress 2019:

Ulrich-Merzenich G, Tüschen A, Schaarchmidt T, Shcherbakova A, Tuleta I, Juergens U.
CD4-cell profiling to support endotypical stratification of severe allergic asthma - an update. Eur. Respir. J. 2019;54(S63):PA4389.

<https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.PA4389>.

Ulrich-Merzenich G, Tüschen A, Schaarschmidt T, Shcherbakova A, Juergens LJ, Tuleta I, Juergens UR: Characterisation of CD4⁺- endotypes in severe allergic asthma for future precision medicine.

AIP Kongress, Witten 2025:

Effects of an omalizumab treatment on cytokines and immune cells in patients with severe asthma – a step towards precision pneumonology

Gudrun Ulrich-Merzenich¹, Tibor Schaarschmidt¹, Andreas Tüschen¹, Anastasiia Shcherbakova¹, Dirk Skowasch², Isabella Tuleta², Carmen Pizarro^{2*}, Uwe R. Juergens^{2*}

11. Danksagung

Ich danke vor allem meiner Frau Charly, die in Phasen größter Frustration und Verzweiflung stets die Ruhe bewahrte und meinen entgleisten Zug wieder behutsam aber mit klarem Fokus auf die Schiene setzte. Sie ist zugleich mein größter Kritiker und mein treuester Fan.

Großer Dank gilt auch meiner Doktormutter Frau Ulrich-Merzenich, die mein Projekt seit 2017 lenkte und leitete. Sie zeigte größte Geduld, als ich mich zu Beginn meiner praktischen Tätigkeit im Labor wie der sprichwörtliche Elefant im Porzellanladen verhielt, und verzieh mir selbst gröbste Schnitzer. Dank Ihrer behutsamen und doch bestimmenden Führung verlief meine Lernkurve steil bergauf und ich konnte reproduzierbare Ergebnisse nach wissenschaftlichen Standards liefern.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für das Korrekturlesen und die Begleitung beim langjährigen Reifeprozess zum fertigen Doktoranden.