

Aus der *asthma and allergy research group* der

Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vostand: Prof. Dr. Dr. med. Christoph Klein.

***Die Bedeutung des Immunoproteasoms und
Inflammasoms bei Asthma bronchiale im Kindesalter
Studien zum „Bauernhofeffekt“ im weltweiten Vergleich***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Tatjana Beuttenmüller

geb. Nicklas

aus Achern

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	<u>Univ. Prof. Dr. med. Bianca Schaub</u>
Mitberichterstatter:	PD Dr. Gerhard Wolf Prof. Dr. rer. biol. hum. Katja Radon
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Asthma bronchiale	6
1.2	Pathophysiologie des Asthma bronchiale	6
1.3	"Bauernhofeffekt"	8
1.3.1	Epidemiologische Unterschiede zwischen verschiedenen Umweltexpositionen.....	8
1.3.2	Bauernhof als protektive Umwelt	8
1.3.3	Mikrobiom und Asthma bronchiale	9
1.3.4	Rolle regulatorischer T-Zellen beim "Bauernhofeffekt"	10
1.4	Immunoproteasom	10
1.4.1	Aufgaben des Immunoproteasoms und Proteasoms.....	10
1.4.2	Rolle des Immunoproteasoms beim Asthma bronchiale.....	11
1.5	Inflammasom	12
1.5.1	Aufgaben des Inflammasoms	12
1.5.2	Rolle des Inflammasoms beim Asthma bronchiale.....	13
2	Fragestellung des Projekts	15
3	Material.....	17
3.1	Reagenzien und Chemikalien	17
3.2	Lösungen und Puffer.....	17
3.3	Versuchskits und Verbrauchsmaterialien	18
3.4	Laborequipment	19
3.5	Software	20

3.6	Primer.....	20
4	Methoden.....	22
4.1	Gewinnung der Staubextrakte.....	22
4.2	Studienpopulation und Rekrutierung	23
4.3	Isolation und Stimulation.....	24
4.4	Genexpression.....	25
4.5	Zytokinmessung.....	29
4.6	Statistische Analyse	29
5	Ergebnisse.....	31
5.1	Charakteristika der Studien-Kohorte	31
5.2	PCR-Ergebnisse	37
5.2.1	Überblick über die Genexpression	37
5.2.2	Genexpression des Immunoproteasoms	38
5.2.3	Genexpression des Inflammasoms	44
5.3	Zytokin-Ergebnisse	52
5.3.1	Überblick über die Zytokinsekretion.....	52
5.3.2	Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen	54
5.3.3	Korrelation der Genexpression und Zytokinsekretion	55
5.3.4	Effekte der Stimulation auf die Zytokinsekretion.....	58
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	62
6	Diskussion	65
6.1	Charakteristika der Studienkohorte	65

6.2	Rolle des Immunoproteasom beim Asthma bronchiale	68
6.3	Rolle des Inflammasoms beim Asthma bronchiale	71
6.3.1	Rolle des NLRP3-Inflammasoms und der Caspasen 1 und 4	71
6.3.2	Relevanz der Interleukine beim Asthma bronchiale	73
6.4	Vergleich der Staubextrakte.....	78
6.5	Limitationen.....	79
6.6	Ausblick zur Asthmaprotektion	82
7	Zusammenfassung	84
8	Literatur	86
9	Anhang	97
9.1	Tabellen	97
9.2	Abkürzungen.....	107
9.3	Abbildungsverzeichnis.....	110
9.4	Tabellenverzeichnis	113
9.5	Danksagung	117
9.6	Affidavit.....	118

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der oberen Atemwege, bei der die Betroffenen wiederholt unter Episoden von Kurzatmigkeit, Engegefühl in der Brust, Giemen und Atemnot leiden [1]. Die Lungenfunktion der Betroffenen ist hierbei deutlich eingeschränkt [2]. Mikroskopisch kann eine Hypertrophie und Hyperreaktivität der Bronchialmuskelschicht beobachtet werden. In Kombination mit der Überproduktion an Mukus führt dies zur Einengung des Bronchiallumens. Je nach Klinik und Untersuchungsbefunden wird zwischen allergischem und nicht-allergischem Asthma bronchiale unterschieden. Allergisches Asthma ist durch allergische Sensibilisierung im Blut, erhöhte IgE-Antikörperspiegel und einen positiven Allergietest der Haut charakterisiert. Es macht die Mehrzahl der Asthma bronchiale-Fälle im Kindesalter aus. Häufige inhalede Allergene sind hierbei Hausstaubmilben, Pflanzenpollen und Tierhaare. Dem gegenüber tritt nicht-allergisches Asthma oft erst später im Leben auf. Betroffen sind hier vor allem Frauen [1]. In dieser Arbeit soll ausschließlich das allergische Asthma betrachtet werden.

Weltweit leiden 339 Millionen Menschen an Asthma bronchiale und 8,6% aller Kinder zeigten schon einmal die genannten Symptome [2]. Trotz der Möglichkeit einer medikamentösen Behandlung mit kurz- und langwirksamen β -Sympathomimetika und Glukokortikoiden bleibt der Leidensdruck für viele Patienten hoch und akute Exazerbationen können zu lebensbedrohlichen Zuständen sowie zum Tod führen. So ist Asthma bronchiale weiterhin der dritthäufigste Grund für Krankenhausaufenthalte im Kindesalter. Zusätzlich verursacht eine dauerhafte Therapie bei steigender Anzahl der Betroffenen einen hohen finanziellen Aufwand [3]. Hinzu kommt, dass die Prävalenz des Asthma bronchiale, sowie anderer Erkrankungen des atopischen Formenkreises in den letzten Jahrzehnten stetig anstieg. So verdoppelte sich die Asthmaprävalenz zwischen 1980 und 2009 [4]. Man rechnet damit, dass dieser Trend bestehen bleibt. Bis 2025 werden weitere 100 Millionen Asthmaerkrankte erwartet [5].

1.2 Pathophysiologie des Asthma bronchiale

Das menschliche Immunsystem besitzt verschiedene Immunantworten als Reaktion auf Pathogene, so, das angeborene, unspezifische Immunsystem, das nicht zwischen unter-

schiedlichen Pathogenen unterscheidet und das erworbene, adaptive Immunsystem, das spezifisch auf die verschiedenen Pathogene reagiert. Eine entscheidende Rolle im erworbenen Immunsystem spielen T-Helferzellen (TH-Zellen). TH1-Zellen sezernieren Zytokine, die zur Induktion der zellulären Immunantwort führen. Sie bekämpfen intrazelluläre Pathogene, wie Viren oder Tumorzellen. TH2-Zellen hingegen führen zur Aktivierung der humoralen Immunantwort. Sie dienen der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen mittels Antikörpern [6]. Diese beiden Immunantworten regulieren sich durch sezernierte Zytokine gegenseitig und stehen im gesunden Immunsystem im Gleichgewicht. Lange Zeit betrachtete man Asthma bronchiale als TH2-abhängige Erkrankung [6, 7]. TH2-Zytokine wie Interleukin 4 (IL-4) und IL-5 führen zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und Plasmazellen [1, 4]. Gleichzeitig supprimieren diese Zytokine die TH1-Antwort. Heute ist jedoch klar, dass die Pathophysiologie des Asthma bronchiale sehr viel komplexer ist und neben TH2-Zellen weitere TH-Zellen involviert sind. So scheinen auch TH17-, TH22-, TH9- und folliculäre TH-Zellen eine Rolle beim Asthma bronchiale zu spielen [8].

Nishizuka und *Sakakura* entdeckten 1969 mit den regulatorischen T-Zellen (Treg) eine weitere, bedeutende T-Zellart. Die Treg erfüllen eine protektive Aufgabe. Mittels Zytokinen (Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β), IL-10) können sie Immunantworten inhibieren und sind von entscheidender Bedeutung für die Balance der Immuntoleranz. So wurde im Mausmodell gezeigt, dass das Fehlen von Treg zur massiven Produktion von Immunglobulin E (IgE), einer Hypereosinophilie und allergischer Atemwegsentzündung führt [4, 9]. Treg scheinen im kindlichen Asthma zentral für den Erhalt der Immunbalance und zum Ausgleich überschießender Reaktionen zu sein. Mütterliche Atopie gilt als Risikofaktor für Asthma bronchiale und bei Kindern atopischer Mütter wurde eine geringere Anzahl und Aktivität der Treg im Nabelschnurblut beobachtet [10]. Weiterhin ist die Therapie mit Glukokortikoiden, die zur deutlichen Besserung der Asthmasymptomatik führt, mit einer Induktion von Treg assoziiert [11]. Auch zeigten einige Studien in Anzahl und Suppressionsfähigkeit eingeschränkte Treg bei an allergischem Asthma bronchiale erkrankten Kindern [7, 11-13]. Diese Beobachtung scheint jedoch altersabhängig zu sein. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass sich dieser Zusammenhang im Laufe der Kindheit wandelt. Im Alter von 6 Jahren konnte, anders als zu früheren Zeitpunkten, eine erhöhte Anzahl an Treg bei Kindern mit allergischem Asthma beobachtet werden [14, 15]. Auch im Erwachsenenalter zeigten sich die Ergebnisse der Studien heterogen. So konnte in einigen Studien ge-

zeigt werden, dass bei erwachsenen Asthmatikern Einschränkungen in der Treg-Antwort bestehen. In anderen Studien zeigte sich das Gegenteil [16-18]. Aufgrund der vielen Ergebnisse wird jedoch vermutet, dass Treg in der Entstehung von Allergien und Asthma zentral involviert sind. Wahrscheinlich liegt bei Asthma bronchiale ein Ungleichgewicht zwischen Treg und TH2-Zellen vor [19]. Die genaue Rolle der Treg im reifenden Immunsystems und in der Entstehung des Asthma bronchiale wird derzeit in vielen Studien untersucht.

1.3 "Bauernhofeffekt"

1.3.1 Epidemiologische Unterschiede zwischen verschiedenen Umweltexpositionen

Die zuvor genannte steigende Prävalenz des Asthma bronchiale lässt sich nicht homogen beobachten. Es werden geographische und kulturelle Unterschiede sichtbar. Die Zunahme der IgE-assoziierten Krankheiten (hierzu gehören sowohl allergisches Asthma als auch Allergien und atopische Dermatitis) lässt sich besonders in Europa und anderen westlichen Teilen der Welt beobachten [20, 21]. Anhand zweier Beispiele wird deutlich, dass die Lebensumstände hierbei eine entscheidende Rolle spielen. So ist die Prävalenz des Asthma bronchiale in Nordkarelien, Finnland dreimal höher als in dem geographisch sehr nahe liegenden Pitkäranta in Karelia, Russland. Die Regionen trennt geographisch nur eine Ländergrenze. Die Lebensart der beiden Populationen ist jedoch sehr unterschiedlich [22]. Ähnliche Umstände ließen sich bei der Teilung Deutschlands beobachten. Obwohl es sich bei der west- und ostdeutschen Bevölkerung um dieselbe Ethnie handelte, unterschieden sich die Allergieprävalenzen während der Teilung Deutschlands immens. In Westdeutschland litten mit 5.9% versus 3.9% deutlich mehr Kinder an Heuschnupfen und Asthma bronchiale als in Ostdeutschland [23]. Nach der Wiedervereinigung glich sich dieses Gefälle mit der wachsenden Homogenität der Lebensumstände an [24]. Die Unterschiede in der Prävalenz sind daher u.a. auch durch unterschiedliche Umweltbedingungen erklärbar.

1.3.2 Bauernhof als protektive Umwelt

Bei näherem Betrachten der verschiedenen Lebensumstände fällt auf, dass die traditionelle Landwirtschaft hier eine besondere Rolle einnimmt. So wird in vielen Studien in Europa gezeigt, dass Kinder, die auf Bauernhöfen mit traditioneller Landwirtschaft

aufwachsen, ein sehr viel geringeres Risiko haben an Asthma bronchiale zu erkranken, als Kinder, die nicht auf einem Bauernhof aufwachsen [25, 26]. Eine Studie aus Beijing, China vergleicht die Asthmaprävalenz von Kindern, die auf dem Land aufwachsen und die Prävalenz der Kinder, die in der Stadt aufwachsen und stellt fest, dass auch die traditionelle chinesische Landwirtschaft einen protektiven Effekt hat [27]. Vergleicht man zwei traditionell lebende Bevölkerungsgruppen in Amerika, die Amischen und die Hutterer, können folgende Beobachtungen gemacht werden: Die Amischen zeigen eine viermal geringere Asthma bronchiale Prävalenz als die Hutterer. Die beiden Bevölkerungsgruppen teilen viele Gewohnheiten in ihrem traditionellen Lebensstil, unterscheiden sich allerdings in den Arten ihrer Landwirtschaft. Die Amischen betreiben traditionelle Landwirtschaft, während die Hutterer das Land maschinell und mit moderneren Methoden bewirtschaften [28]. So zeigt sich, dass der Kontakt zu traditioneller Landwirtschaft den bisher größten bekannten protektiven Faktor gegen Asthma bronchiale darstellt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass schon der intrauterine Kontakt zu Nutztieren und Futtermitteln einen protektiven Effekt hat [29].

1.3.3 Mikrobiom und Asthma bronchiale

Schon 1989 postulierte *Strachan* die "Hygienehypothese", nach der reduzierte Infektionen im Kindesalter mit einem erhöhten Risiko für allergische Erkrankungen einhergehen. Durch den steigenden Standard der Hygiene habe sich die Vielfalt des Mikrobioms verringert und es wurden „allergie-protektive“ Einflüsse reduziert. Es wird vermutet, dass das Immunsystem durch den Kontakt zu unterschiedlichen mikrobiellen Erregern moduliert wird. Der genaue Mechanismus bleibt bisher jedoch unbekannt [30]. Man geht heute davon aus, dass nicht nur der Darm und die oberen Luftwege mikrobiell besiedelt sind, sondern auch die Lunge. Asthmatiker und nicht-Asthmatiker unterscheiden sich in ihrem Mikrobiom und es wird vermutet, dass diese Veränderungen mit der Entstehung des Asthma bronchiale zusammenhängt [31-34]. Auch der protektive "Bauernhofeffekt" scheint mit einer hohen Varianz an Mikroorganismen assoziiert zu sein. So korreliert eine größere Vielfalt an Mikroorganismen negativ mit dem Risiko an Asthma bronchiale zu erkranken (*Gabriela und Parsifal Studie*) [35]. Der Staub in den Matratzen der Kinder von Bauernhöfen konnte als Marker für das Risiko an Asthma bronchiale zu erkranken gewertet werden. So zeigten Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, einen höheren Bakterienbestand in ihrem Matratzenstaub als eine Referenzgruppe [35,

36]. Auch in Tiermodellen konnte ein protektiver Effekt einzelner Bestandteile von Bauernhofstaub beobachtet werden [37].

1.3.4 Rolle regulatorischer T-Zellen beim "Bauernhofeffekt"

Betrachtet man regulatorische T-Zellen (Treg) im Zusammenhang mit dem "Bauernhofeffekt", so fällt auf, dass Kinder von Müttern, die während ihrer Schwangerschaft auf einem Bauernhof lebten und in Kontakt mit Futtermitteln und Nutztvieh standen, erhöhte und in ihrer Suppressionsfähigkeit effizientere Treg aufweisen [38]. Auch bei Kindern, die vermehrt rohe Kuhmilch tranken, zeigte sich die Treg-Anzahl mit 4,5 Jahren erhöht [39]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass gleichaltrige Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, eine gesteigerte Treg-Funktion besitzen, was wiederum negativ mit dem Auftreten von Asthma bronchiale assoziiert ist. Dieser Effekt scheint sich im Alter von 6 Jahren umzudrehen. In diesem Alter zeigen Kinder, die keinen Kontakt zu Bauernhöfen hatten, eine erhöhte Treg-Anzahl. Dies korreliert wiederum positiv mit dem Risiko für Asthma bronchiale [14]. Wie zuvor berichtet geht man davon aus, dass das Immunsystem durch den Kontakt mit Mikroorganismen moduliert wird. Durch mangelnden Kontakt mit Bakterien und Viren könnte es zu weniger funktionsfähigen Treg kommen [9]. In vielen Studien konnte gezeigt werden, wie verschiedene Erreger wie z.B. *Bacteroides fragilis* oder *Helicobacter pylori* im Mausmodell zur Induktion einer verstärkten Treg-Antwort führen [40-43]. All diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und dem "Bauernhofeffekt" vermuten.

1.4 Immunoproteasom

1.4.1 Aufgaben des Immunoproteasoms und Proteasoms

Das Proteasom ist ein ubiquitär in allen Zellen vorhandener Proteinkomplex, der für den Abbau und die Prozessierung von ubiquitinierten Proteinen verantwortlich ist [44]. Unter Interferon (INF-) γ - und Tumor-nekrose Faktor (TNF-) α -Einfluss wird anstelle des Proteasoms vermehrt das Immunoproteasom exprimiert. Das Immunoproteasom ähnelt im Aufbau dem Proteasom. Beide Komplexe bestehen aus zwei äußeren α -Ringern und zwei inneren β -Ringern, die jeweils aus sieben Untereinheiten aufgebaut sind. In diesen β -Ringern befinden sich beim Proteasom die katalytischen Einheiten $\beta 1$ (PSMB6), $\beta 2$ (PSMB7) und $\beta 5$ (PSMB5). Diese Einheiten werden beim Immunoproteasom nun durch $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) ersetzt [45, 46]. Das Immunoproteasom

besitzt mit seinen ausgewechselten katalytischen Einheiten die Fähigkeit einer schnelleren und effizienteren *major histocompatibility complex (MHC)*-Präsentation. Zusätzlich ist das Spektrum der Antigene für die *MHC*-Präsentation erweitert [47, 48]. Diese Veränderung ist mit einer vermehrten Prozedion von naiven T-Zellen zu TH2-Zellen und TH17-Zellen assoziiert [49]. Neben dem Effekt der veränderten *MHC*-Präsentation werden dem Immunoproteasom weitere immunologische Funktionen zugeschrieben. Inhibition von LMP7 vermindert die Zytokinproduktion (IL-6, IL-23, TNF- α) in Lipopolysaccharid (LPS) -stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMCs*), sowie in CD3/28-stimulierten *PBMCs*. Weiterhin führt die Inhibition von LMP7 zu einer veränderten T-Zell Antwort. Das Immunoproteasom scheint somit eine komplexe Funktion in der Regulation der T-Zell-Antwort inne zu haben [50].

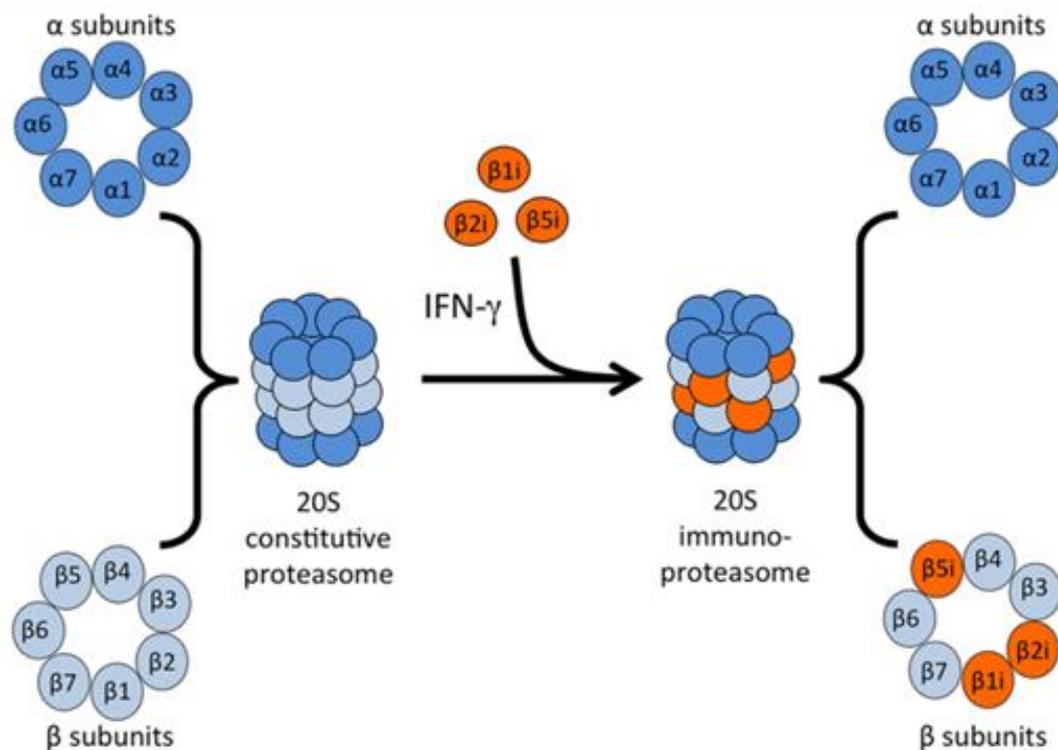


Abbildung 1: Das Proteasom und das Inflammasom im Vergleich [47]. Durch Stimulation mit IFN- γ werden die katalytischen Einheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ durch die katalytischen Einheiten des Immunoproteasoms $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) ersetzt.

1.4.2 Rolle des Immunoproteasoms beim Asthma bronchiale

In vielen Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel der Kolitis ulzerosa oder der rheumatoiden Arthritis, konnte die Bedeutung des Immunoproteasoms bereits nachgewiesen werden [50, 51]. Eine Studie von *Kalim et al.* konnte bei spezifischer Inhibition

von LMP7 in einem experimentellen *in vivo* Kolitis-Modell eine reduzierte TH1- und TH17-Antwort, sowie eine erhöhte Treg-Differenzierung nachweisen. Auch in TH2-getriggerten Autoimmunerkrankungen wird ein Effekt erwartet. In vielen Studien mit unspezifischen Proteasom-Inhibitoren konnten bereits positive Effekte auf Asthma bronchiale beobachtet werden [52, 53]. Doch auch die spezifische Inhibierung des Immunoproteasoms scheint eine Wirkung zu haben. In einem LMP7-defizienten murinen Ovalbumin-induziertem Asthma bronchiale Modell (OVA) wurde ein milderer Asthma-Phänotyp mit einer signifikanten Reduktion von inflammatorischen Zellen, wie Eosinophilen, Lymphozyten und Neutrophilen, sowie von OVA-spezifischem IgG und weiterhin eine Reduktion der TH2-Zellen und deren Zytokine gezeigt [54]. Das murine Ovalbumin-induzierte Asthmodell wird aufgrund der vielen Parallelen zum humanen allergischen Asthma bronchiale oft in murinen Versuchen verwendet [55]. Ob das Immunoproteasom eine Bedeutung in der veränderten T-Zellantwort beim "Bauernhofeffekt" hat, blieb bisher offen. Es kann jedoch durchaus vermutet werden, dass durch den Kontakt mit unterschiedlichen Pathogenen auf dem Bauernhof eine veränderte *MHC*-Präsentation und damit eine veränderte T-Zellantwort resultiert und das Immunoproteasom dabei eine entscheidende Rolle einnimmt.

1.5 Inflammasom

1.5.1 Aufgaben des Inflammasoms

Das Inflammasom ist ein in Myeloid-, Epithel- und lymphoiden Zellen vorkommender intrazellulärer Proteinkomplex [56]. Es triggert die Autoaktivierung von Caspase 1 (CASP1) und damit verbunden die Umsetzung von proinflammatorischen Interleukinen. Pathogen-assoziierte molekulare Partikel (*PAMPs*) und Gefahr-assoziierte molekulare Partikel (*danger-associated molecular patterns, DAMPs*), unter anderem freies ATP oder reaktive Sauerstoffradikale (ROS) führen über verschiedene Mechanismen zur Dimerisierung und somit zur Aktivierung des Inflammasoms [57-59]. In der Familie der Inflammasome gibt es verschiedene Typen. In dieser Arbeit soll der Fokus auf das bisher am besten charakterisierte NLRP3-Inflammasom gelegt werden. Das NLRP3-Inflammasom besteht aus verschiedenen Untereinheiten: die NLRP3-Region bindet im aktivierten Zustand über die Pyrin-Domäne (PYD) an die PYD des Adapterproteins (ASC). Dieses wiederum bindet über die Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) an die CARD der Caspase 1. Bindung der Caspase 1 und Dimerisierung führt zu Autoaktivierung und Umsetzung von pro-Interleukin 1 β (IL-1 β) und pro-Interleukin 18 (IL-18)

zu aktivem IL-1 β und IL-18, welches von der Zelle sezerniert wird [60]. Die Regulierung und Aktivierung des Inflammasoms erfolgt über multiple Wege (Beispiele in Abbildung 2), die bis heute noch nicht alle im Detail verstanden sind.

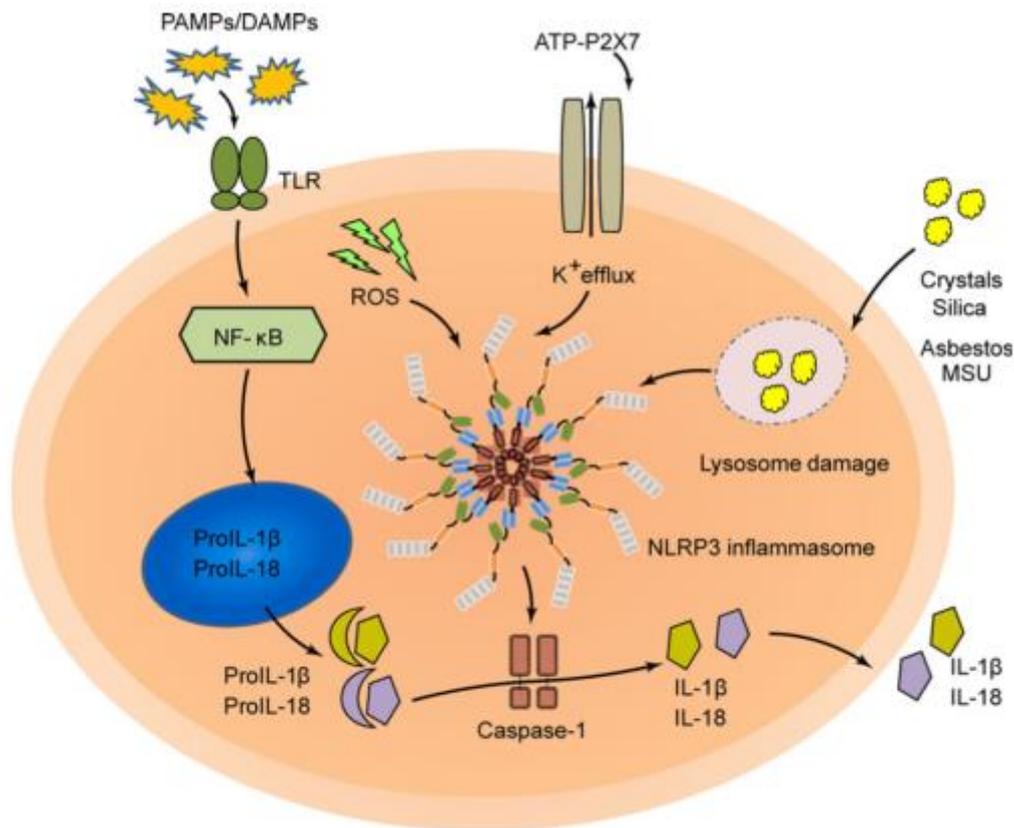


Abbildung 2: Signalweg des Inflammasoms. Verschiedene Einflüsse, die zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen und somit zur IL-1 β und IL-18 Synthese [61].

1.5.2 Rolle des Inflammasoms beim Asthma bronchiale

Viele Studien im Mausmodell sowie mit humanem Probenmaterial deuten auf eine Rolle des Inflammasoms und der zugehörigen Zytokine in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale hin. Eine weltweite Genomstudie zeigte eine signifikante Assoziation zwischen einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single-Nucleotid-Polymorphismus*, *SNP*) im IL-18-Rezeptor 1 Gen und Asthma bronchiale [62]. Ein anderer *SNP* im NLRP3-Gen konnte mit Aspirin-induziertem Asthma, sowie mit Nahrungsmittelallergien assoziiert werden [63]. Weiterhin zeigten Studien, dass eine erhöhte NLRP3-Expression in einer für Asthma bronchiale typischen TH2-Antwort resultiert. Im OVA-Mausmodell konnte durch Deletion des NLRP3-Inflammasoms eine deutliche Besse-

rung der asthmatischen Symptome, eine signifikant verringerte eosinophile Granulozyten-Infiltration in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie signifikant verringerte IgE-Werte beobachtet werden [64]. In humanen Studien konnte ein erhöhtes NLRP3- und Caspase 1-Level in der BAL von Asthmatikern detektiert werden [59] sowie erhöhte Level an ATP und Harnsäure in den Atemwegen, welche als Aktivatoren des Inflammasoms bekannt sind [65].

In vielen Studien konnte weiterhin eine Bedeutung für die, durch das Inflammasom aktivierten Interleukine, IL-1 β sowie IL-18 entdeckt werden. So führt ein Defizit an IL-1 β (und Interleukin 1 α (IL-1 α)) ebenfalls zu einer reduzierten TH2-Antwort sowie zu Reduktion der Atemwegsentzündung [66]. Auch konnte in vielen Studien ein erhöhter IL-1 β und IL-18 Spiegel bei Asthma-Patienten nachgewiesen werden [15, 67-69]. Neben IL-1 β gehört auch IL-1 α zur Interleukin 1-Familie. Sie teilen die Funktion am IL-1-Rezeptor 1 zu binden. Blockiert man diesen Rezeptor im Mausmodell resultiert eine verringerte Asthmasymptomatik.

Im Rahmen dieser Arbeit wird angenommen, dass das Inflammasom am "Bauernhofeffekt" beteiligt ist. Das NLRP3-Inflammasom detektiert unzählige Endotoxine verschiedener Bakterien, wie *Greaney et al.* in ihrem Review zusammenfassen [70]. Es wird außerdem angenommen, dass es Endotoxine gibt, die eine Aktivierung des Inflammasoms verhindern können [71]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das NLRP3-Inflammasom in Lungenepithelien auf Feinstaub mit Caspase 1-Aktivierung und IL-1 β -Produktion reagiert [72]. Das NLRP3-Inflammasom kann somit über Interaktion mit Endotoxinen und anderen Umweltkomponenten eine Bedeutung im "Bauernhofeffekt" haben. Ob und welche Bedeutung genau ist noch ungeklärt.

2 Fragestellung des Projekts

Die Prävalenz von allergischem Asthma bronchiale und anderen Erkrankungen des atopischen Formenkreises stieg in den letzten Jahrzehnten weiterhin an. Es ist bekannt, dass sich die Lebensumstände unter denen Kinder aufwachsen, auf das Risiko an Asthma bronchiale zu erkranken auswirken. So ist das Aufwachsen auf einem Bauernhof der stärkste heutzutage bekannte protektive Faktor gegen Asthma. Erkenntnisse über die, diesem „Bauernhofeffekt“ zugrunde liegenden Mechanismen können helfen, die zugrundeliegende Pathophysiologie des Asthma bronchial besser zu charakterisieren und neue Präventions- und Therapiestrategien zu entwickeln.

Die Signalwege des Immunoproteasoms und Inflammasoms spielen beim „Bauernhofeffekt“ möglicherweise eine zentrale Rolle.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des Inflammasoms und Immunoproteasoms beim kindlichen Asthma bronchiale sowie im Zusammenhang mit dem "Bauernhofeffekt" im Detail zu charakterisieren.

Um die Bedeutung der beiden Signalwege zu erfassen, wird die Expressionen ausgewählter Gene, in mittels Dichtezentrifugation gewonnener *PBMCs* von Kindern mit allergischem Asthma und gesunden Kindern verglichen. Hierfür werden die *PBMCs* 24h mit vier verschiedenen Staubextrakten sowie LPS und anti-CD3/CD28-Antikörpern als Positivkontrollen stimuliert. Die Staubextrakte wurden in verschiedenen Lebensräumen gesammelt, so auf Bauernhöfen in Deutschland und Finnland, in einem ländlichen Haushalt in China, somit dem Äquivalent eines Bauernhofes und bei den Amischen, einer traditionell lebenden Bevölkerungsgruppe in den USA. Nach Stimulation wird die Genexpression mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion (*quantitativen real-time polymerase chain reaktion, qRT-PCR*) und die Zytokinsekretion mittels Luminex-Technologie bestimmt.

Folgende Hypothesen werden bezüglich des Immunoproteasoms untersucht:

1A) Markergene des Immunoproteasoms in PBMCs sind bei allergischen Asthmatikern stärker exprimiert als bei gesunden Kindern.

1B) Durch die Stimulation von PBMCs mit den Staubextrakten wird die Genexpression des Immunoproteasoms in PBMCs im Vergleich zu unstimulierten Zellen herunter reguliert.

1C) Bei Kindern mit allergischem Asthma zeigt sich eine stärkere "Down-Regulation" des Immunoproteasoms nach Stimulation der PBMCs mit den Staubextrakten als bei gesunden Kontrollen.

Um diese Hypothesen über den Signalweg des Immunoproteasoms zu untersuchen, werden die katalytischen Einheiten des Immunoproteasoms (*LPM2*, *LMP7*, *MECL1*) sowie repräsentativ für das Proteasom die Untereinheit *PSMA3* betrachtet. Zur weiteren Erfassung des MHC-I-Signalweges wird der Transporter TAP2 in die Analyse eingeschlossen.

Bezüglich des Inflammasoms werden folgende Hypothesen aufgestellt:

2A) Marker des Inflammasoms sowie die Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-1 α werden in PBMCs von Kindern mit allergischem Asthma bronchiale stärker exprimiert, die Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-1 α stärker sezerniert, als bei gesunden Kontrollen.

2B) Durch die Stimulation von PBMCs mit den Staubextrakten vom Bauernhof werden im Vergleich zu unstimulierten Zellen die Gene des Inflammasoms stärker exprimiert.

2C) Allergische Asthmatiker zeigen eine stärkere Steigerung der Genexpression des Inflammasoms durch die Stimulation mit den Staubextrakten als gesunde Kontrollen.

Zur Erfassung des Signalweges des Inflammasoms wird die Genexpression des NLRP3-Inflammasoms selbst, sowie die, durch das Inflammasom aktivierten, Caspasen 1 und 4 erfasst. Weiterhin werden die NLRP3 abhängigen Interleukine Interleukin 1 β , 18 und 1 α sowohl auf der Ebene der Genexpression, als auch auf Proteinebene verglichen.

3 Material

3.1 Reagenzien und Chemikalien

100bp DNA Leiter Standard (500µg/ml)	New England BioLabs, Ipswich, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-CD28 Antikörper	Thermo Fisher Scientific, eBioscience™, Waltham, USA
Anti-CD3 Antikörper (OKT3)	Thermo Fisher Scientific, eBioscience™, Waltham, USA
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Bromphenol blau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA 0.5M (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromide (10mg/ml)	Biorad, Hercules, USA
Ficoll-Paque™ PLUS solution	GE Healthcare, Chicago, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
H2O bidest.	H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
LPS von E. coli serotype O111:B4	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Thermo Fisher Scientific, Gibco™, Waltham, USA
Primer	Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1640 Medium + GlutaMax™	Thermo Fisher Scientific, Gibco™, Waltham, USA
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Water DEPC (0.1 %)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
X-VIVOTM 15 Medium	Lonza, Basel, Schweiz

3.2 Lösungen und Puffer

5X TBE Puffer	54g <i>trizma base</i> 27.5g Borsäure 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0) 1l H2O bidest.
DNA Leiterstandard	10µl 100bp DNA Leiterstandard

	80µl 0.5x TBE-Buffer
	10µl <i>loading dye</i> verdünnt
Ethidiumbromide [500µg/ml]	100µl ethidiumbromide
	1.9 ml H ₂ O
<i>Loading dye</i> unverdünnt	0.25g Bromphenol blau
	0.25g Xylene Cyanol
	30% Glycerol
	70ml dH ₂ O
<i>Loading dye</i> verdünnt	5ml <i>loading dye</i> stock solution
	13.5ml glycerol
	31.5ml dH ₂ O

3.3 Versuchskits und Verbrauchsmaterialien

24-well-Zellkulturplatte, Primaria™	Corning, Corning, USA
96-well White Shell PCR Platte	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
AllergyScreen®	MEDIWISS Analytic GmbH, Moers, Deutschland
BD Vacutainer® Heparinröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 0.1-20µl	Sarstedt, Heidelberg, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 10µl M 40mm type D	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 2-100µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blutabnahmeset Vacutainer® Safety-Lok™	BD, Franklin Lakes, USA
<i>conical centrifuge tubes Falcon®</i> (50ml, 15ml)	Corning, Corning, USA
Corning® 2mL <i>Cryogenic Vial</i>	Corning, Corning, USA
Filterspitzen 100ml, <i>low binding SafeSeal®</i>	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Human Cytokine Multiplex Assay Kit, BioPlex Pro™	Biorad, Hercules, USA
Leucosep™	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikrozentrifugenröhrchen (1.5ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen <i>Safe-Lock</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

(2.0ml)	
Mikrozentrifugenröhrchen,, Multiply® - mStrip Pro 8 (0.2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microseal® 'B' seal seals	Biorad, Hercules, USA
Pasteurpipetten, steril	VWR International, Radnor, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Gibco™, Waltham, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Gibco™, Waltham, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SafeGuard Filterspitzen 100-1000µl	Peqlab, Erlangen, Deutschland
sereologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette, EDTA, 1,2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette, Serum, 2,7ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sso advanced SYBR green Supermix	Biorad, Hercules, USA

3.4 Laborequipment

Bio-Plex® 200 System	Biorad, Hercules, USA
CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System	Biorad, Hercules, USA
Electrophorese Netzgerät	VWR International, Radnor, USA
Gel iX Imager	Intas Science Images Instruments, Göttingen, Deutschland
Inkubator HERAcell® 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Micro Centrifuge II	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0.1mm	Karl Hecht, Assistent®, Sondheim/Rhön, Deutschland
<i>Owl D3-14 wide gel electrophoresis sys- tem</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Thermocycler PeqSTAR 96 universal	Peqlab, Erlangen, Deutschland y
Perfect Spin P	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipette EasyPet®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Research plus</i> Pipette 0.1-2.5µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<i>Research plus</i> Pipette 0.5-10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Research plus</i> Pipette 10-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Research plus</i> Pipette 2-20µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage Explorer® Analytical	OHAUS, Parsippany, USA
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Jouan CR412	Jouan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge <i>Perfect SpinP</i>	Peqlab, Erlangen, Deutschland

3.5 Software

Bio-plex Manager Software Version 4.1.1	Biorad, Hercules, USA
Biorad CFX Manager 2.1	Biorad, Hercules, USA
EndNote X7	ISI ResearchSoft, Berkeley, USA
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/
GraphPad Prim 8	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer-BLAST designing tool	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ , NCBI, Bethesda MD, USA
R version 3.6.0 (2019-04-26)	R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org
SPSS version 23	SPSS IBM Inc., Armonk, USA
Vector NTI 10 Advance 11.5	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.6 Primer

Gene	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
18S	AGTCCCTGCCCTTTGTACACA	GATCCGAGGGCCTCACTAAAC
NLRP3	AAAGCAAAAAGAGATGAGCCGAAG	CCTCAACAAACGCTACACACGACT
CASP1	CGCTTTCTGCTCTTCCACACC	GAGCAGCCAGATGGTAGAGCG
CASP4	CGTATGGCAGGACAAATGCTTCTTC	CCAATAAAGGAGAGAAACAACCGCA
IL-1β	TGGCAATGAGGATGACTTGTTTC	CCTGAGCACCTTCTTTCCCTT
IL-18	GAATGCCGACCTGAAAATGGAG	GTTACTGACTTCACATTCTTGCCCCA

IL-1 α	GCCCAAGATGAAGACCAACCAG	CAAGACTACTGGGTGTGCTTGGC
LMP2	AGGCGAGGCGGTGGTGAA	GGCTGGGACCAACGTGAAGG
LMP7	CCACCACGCTCGCCTTCAA	CATGGGACTCGGCTCTCAGGA
MECL1	CGAGAACTGCCAAAGAAATGC	ATCCACTTCATCGCCCCC
PSMA3	ACAGTGTGAATGACGGTGCG	GCAGCTTGCCTGGCTTTG
TAP2	CCGCCTTCTTCTCCTTGTC	GGTCAAAGTGGTGGGGCTGTAT

4 Methoden

Staubgewinnung, Teile der Rekrutierung sowie Isolation, Stimulation, cDNA-Synthese und Zytokinmessung einiger Patientenproben sowie Teile der statistischen Auswertung wurden von anderen Mitgliedern der AG Schaub durchgeführt. Teile der Rekrutierung mit Befragung der Patienten und Aufklärung, Isolation der PBMCs mittels Ficoll-Dichtezentrifugation, Stimulation mit den Staubextrakten, RNA-Isolation und cDNA-Synthese, Primerdesign, RT-qPCR Durchführung, Qualitätssicherung mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese sowie die statistischen Auswertung der sozioökonomischen sowie klinischen Angaben und graphische Darstellung aller Ergebnisse wurden von mir durchgeführt.

4.1 Gewinnung der Staubextrakte

Sammlung der Staubextrakte

Die Staubextrakte für die Stimulation der *PBMCs* wurden an vier Standorten weltweit gesammelt. Das deutsche Staubextrakt stammt von einem Bauernhof in Icking (Süd-Bayern), das chinesische Staubextrakt von einer Hühnerfarm im Raum Conghua, das finnische Staubextrakt aus Kitee und der Staub der Amischen von Bauernhöfen der *Amish People* in den USA.

Elektrostatische Staubkollektoren (*electrostatic dust collector, EDC*) wurden sterilisiert in Kunststoffmappen verpackt. Die *EDCs* wurden an die teilnehmenden Bauernhöfe versendet und jeweils drei *EDCs* in einem Stall ausgelegt. Auf den beigelegten Dokumentationsbögen wurden Platzierung, genauer Zeitpunkt der Sammlung, Höhenunterschied zum Boden und besondere Ereignisse während der Sammelzeit dokumentiert. Nach vier Wochen wurden die *EDCs* verpackt und für das weitere Procedere an unser Labor versendet.

Extraktion der Staubextrakte

Die Staubextraktion erfolgte unter sterilen Bedingungen nach dem Protokoll der NaCl-Extraktion nach Prof. Dr. Otto Holst, Forschungszentrum Borstel [73].

Die *EDCs* wurden sechs Stunden in 400ml 0,9%iger-Natrium-Chlorid-Lösung eingeweicht und final mittels Pinzette ausgerungen. Um große Partikel aus der Suspension zu entfernen, wurden jeweils 200ml der Suspension zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Des Weiteren wurde die Suspension durch Dialyse aufgereinigt. Hierfür wur-

den jeweils 200ml der Suspension in einen Dialyseschlauch gefüllt und in 5 Liter destilliertes Wasser gelegt, welches alle vier Stunden gewechselt wurde. Der Vorgang wurde vier Mal wiederholt.

Darauffolgend wurde die Staubsuspension mittels Vakuum durch eine Membran (Porengröße 0.2µm) des *Stericup* sterilfiltriert und anschließend in einen Rundkolben gefüllt. Dieser wurde durch gleichmäßiges Drehen in flüssigem Stickstoff eingefroren und an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. Nach vollständiger Trocknung wurde der Rundkolben mit 30ml *aqua injectabilia* ausgewaschen, erneut eingefroren und getrocknet. Nach erneuter vollständiger Trocknung wurde ein zweites Mal gespült und ein letztes Mal mittels Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Das fertig isolierte Staubextrakt wurde standardisiert mit PBS verdünnt (40µg/ml).

4.2 Studienpopulation und Rekrutierung

Im Rahmen der *CLinical Asthma Research Association* (Clara-Studie) werden Kinder mit allergischem Asthma bronchiale und gesunde Kontrollen verglichen. Die Rekrutierung der Studienprobanden für diese Arbeit erfolgte in den Jahren 2015-2016 (Vgl. [15]). Die Ethik-Nummer der Studie lautet Projekt Nr. 379-08.

Patienten mit allergischem Asthma bronchiale wurden in der Allergie- und Asthmaambulanz des von Haunerschen Kinderspitals und in der Kinderarztpraxis am Arabellapark in München rekrutiert, gesunde Kontrollpatienten in der chirurgischen Tagesklinik des von Haunerschen Kinderspitals sowie an einem Gymnasium im Raum München. Nach vollständiger Aufklärung und schriftlicher Zustimmung der Eltern zur Studienteilnahme, erfolgten die Blutentnahme und ein Fragebogen zu Asthma -und Allergiesymptomen, der Familienanamnese und den sozioökonomischen Daten wurde erhoben. Ein *AllergyScreen* Test von Mediwiss wurde durchgeführt.

	Asthmatiker	Gesunde Kontrollen
Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> - Alter 4-14 Jahre - mind. 3 obstruktive Bronchitiden in der Vergangenheit - Arzt diagnose rezidivierende obstruktive Bronchitiden - Einnahme Asthmamedikation in der Vorgeschichte 	<ul style="list-style-type: none"> - Alter 4-14 Jahre - gesunde Kinder
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> - andere pulmologische Erkrankungen - andere chronische Erkrankungen - Autoimmunerkrankungen, Immundefekte - fieberhafter Infekt in den letzten 14 Tagen - Einnahme von Steroiden, Antibiotika, Probiotika in den letzten 14 Tagen - Durchführung einer Hyposensibilisierung 	<ul style="list-style-type: none"> - pulmologische Erkrankungen - allergische Erkrankungen - chronische Erkrankungen - Autoimmunerkrankungen, Immundefekte - fieberhafter Infekt in den letzten 14 Tagen - Einnahme von Steroiden, Antibiotika, Probiotika in den letzten 14 Tagen

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien der Studienkohorte.

4.3 Isolation und Stimulation

Die abgenommenen Serum- und EDTA-Röhrchen wurden innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet. Nach Zentrifugation wurden jeweils 500µl Serum und Plasma abgenommen. Das Serum sowie das Zellpellet wurden bei -20°C, Plasma und zugehöriges Zellpellet bei -80°C asserviert.

Aus dem 2:1 mit PBS verdünnten heparinisierten Vollblut wurden innerhalb der ersten 24h mittels Ficoll-Dichtezentrifugation mononukleäre Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC*) isoliert. Durch Zentrifugation wird ein Dichtegradient erzeugt, in dem sich Erythrozyten, Granulozyten und mononukleäre Zellen trennen. Dies ermöglichte eine Isolation der mononukleären Zellen durch spezifisches Pipettieren der

entsprechenden Zellschicht. Die *PBMCs* wurden erneut zentrifugiert und das Zellpellet mit 14ml RPMI resuspendiert. Mittels Neubauer Zählkammer wurden die Zellen gezählt und auf eine finale Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml mit X-Vivo-Medium verdünnt. Jeweils $2,5 \times 10^6$ *PBMC* wurden mit einem der sechs Stimuli versetzt. Neben jeweils einem Staubextrakt aus Deutschland, Finnland, China und von den Amischen (finale Konzentration $40 \mu\text{g/ml}$) wurden Anti-CD3- Anti-CD28-Antikörper (antiCD3 f.c. $3 \mu\text{g/ml}$, antiCD28 f.c. $1 \mu\text{g/ml}$) und LPS (f.c. $0,1 \mu\text{g/ml}$) für 24h als Positivkontrollen hinzugefügt. Aufgrund der teilweise großen Volumenzugabe wurden die finalen Ansätze mit X-Vivo-Medium auf $600 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Die stimulierten Zellen, sowie eine unstimulierte Negativkontrolle (Media) wurden für 24h bei 37°C und einer CO_2 Konzentration von 5% inkubiert. Nach Stimulation und Zentrifugation wurden die Überstände zum Messen der Zytokine abgenommen und bei -80°C asserviert. Die Zellpellets wurden mittels $350 \mu\text{l}$ 10%ig β -Mercaptoethanol in RLT-Puffer lysiert und bei -80°C gelagert.

4.4 Genexpression

RNA-Isolation

Die RNA wurde mittels des RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach Protokoll isoliert. Die finale Konzentration der RNA wurde mittels Nanodrop2000 photometrisch bestimmt.

cDNA

Die cDNA wurde mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Protokoll synthetisiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Primerdesign

Die Primer wurden mittels Primer 3, BLAST und Vector NTI designt und bei Invitrogen™ hergestellt.

Quantitative Real Time RT-PCR

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaktion, PCR*) basiert auf einer zyklusabhängigen DNA Vervielfältigung, welche kleinste Mengen an DNA detektierbar macht. Die DNA Vervielfältigung erfolgt, mittels einer DNA-Polymerase, der hitzebeständigen Taq-Polymerase, nach dem natürlichen Prinzip der menschlichen Zelle. Nach dem Schritt der Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt wird (bei 95°C), folgt der Schritt der Primeranlagerung bei $62,5^\circ\text{C}$. Im letzten Schritt folgt die Elongation. Die quantitative Echtzeit *PCR* (*quantitativen real-*

time PCR, qPCR) ermöglicht, neben absoluter Detektion, Rückschlüsse auf die Menge der vorhandenen mRNA. Mittels aus mRNA gewonnener cDNA ist es somit möglich, Aussagen über den Einfluss der Stimuli auf die Genexpression zu treffen. Das Prinzip der *qPCR* gleicht in ihren Schritten der *PCR*. Zusätzlich wird jedoch *SYBR green* (Bio-rad) als Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. So ermöglicht der Zeitpunkt der Fluoreszenzdetektion einen Rückschluss auf die vorhandene cDNA bzw. ursprüngliche mRNA Menge. Die Spezifität wurde durch Ausschluss von Primer-Dimeren und unspezifischen Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese sichergestellt.

Pipettierschema

Die *qPCR* wurde in Duplikaten durchgeführt. Neben den elf Zielgenen wurde *18S* als *Housekeeping*-Gen hinzugefügt und Negativkontrollen (*NTC*) durchgeführt. *Housekeeping*-Gene sind Gene, die unabhängig von Individuum, Zelltyp, Zellstadium und regulatorischen Einflüssen konstant exprimiert werden. Sie dienen der Normalisierung der Ergebnisse.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S 500 G_24h	NLRP3 500 G_24h	CASP1 500 G_24h	CASP4 500 G_24h	IL-1β 500 G_24h	IL-18 500 G_24h	IL-1a 500 G_24h	LMP2 500 G_24h	LMP7 500 G_24h	MECL1 500 G_24h	PSMA3 500 G_24h	TAP2 500 G_24h
B	18S 500 G_24h	NLRP3 500 G_24h	CASP1 500 G_24h	CASP4 500 G_24h	IL-1β 500 G_24h	IL-18 500 G_24h	IL-1a 500 G_24h	LMP2 500 G_24h	LMP7 500 G_24h	MECL1 500 G_24h	PSMA3 500 G_24h	TAP2 500 G_24h
C	18S 500 Fi_24h	NLRP3 500 Fi_24h	CASP1 500 Fi_24h	CASP4 500 Fi_24h	IL-1β 500 Fi_24h	IL-18 500 Fi_24h	IL-1a 500 Fi_24h	LMP2 500 Fi_24h	LMP7 500 Fi_24h	MECL1 500 Fi_24h	PSMA3 500 Fi_24h	TAP2 500 Fi_24h
D	18S 500 Fi_24h	NLRP3 500 Fi_24h	CASP1 500 Fi_24h	CASP4 500 Fi_24h	IL-1β 500 Fi_24h	IL-18 500 Fi_24h	IL-1a 500 Fi_24h	LMP2 500 Fi_24h	LMP7 500 Fi_24h	MECL1 500 Fi_24h	PSMA3 500 Fi_24h	TAP2 500 Fi_24h
E	18S 500 CH_24 h	NLRP3 500 CH_24 h	CASP1 500 CH_24 h	CASP4 500 CH_24 h	IL-1β 500 CH_24 h	IL-18 500 CH_24 h	IL-1a 500 CH_24 h	LMP2 500 CH_24 h	LMP7 500 CH_24 h	MECL1 500 CH_24 h	PSMA3 500 CH_24 h	TAP2 500 CH_24 h
F	18S 500 CH_24 h	NLRP3 500 CH_24 h	CASP1 500 CH_24 h	CASP4 500 CH_24 h	IL-1β 500 CH_24 h	IL-18 500 CH_24 h	IL-1a 500 CH_24 h	LMP2 500 CH_24 h	LMP7 500 CH_24 h	MECL1 500 CH_24 h	PSMA3 500 CH_24 h	TAP2 500 CH_24 h
G												
H	18S NTC	NLRP3 NTC	CASP1 NTC	CASP4 NTC	IL-1β NTC	IL-18 NTC	IL-1a NTC	LMP2 NTC	LMP7 NTC	MECL1 NTC	PSMA3 NTC	TAP2 NTC

Abbildung 3: Pipettierschemata der *qRT-PCR* Platte. Horizontal wird die Patientenprobe aufgetragen. Vertikal die verschiedenen Primer. *NTC*, Negativkontrolle ohne cDNA.

Die *PCR*-Platte wurde nach Abbildung 3 pipettiert. In jedes *well* wurden 5µl SYBR Green und 3.2µl Primer (0,1mM) pipettiert. Dazu kamen (außer in *NTC*-Wells) 6ng cDNA, mit RNase freiem Wasser auf 1.8µl aufgefüllt. In markierten *NTC*-Vertiefungen wurden anstatt cDNA nur 1.8µl RNase freies Wasser pipettiert. Final fanden sich in

jeder Vertiefung 10µl Lösung. Die pipettierte Platte wurde, mit Folie verschlossen und zentrifugiert, um mögliche Lufteinschlüsse zu eliminieren.

Cycler-Protokoll

Der *iCycler*® führte die *qPCR* anhand des folgenden Protokolls durch (Abbildung 4).

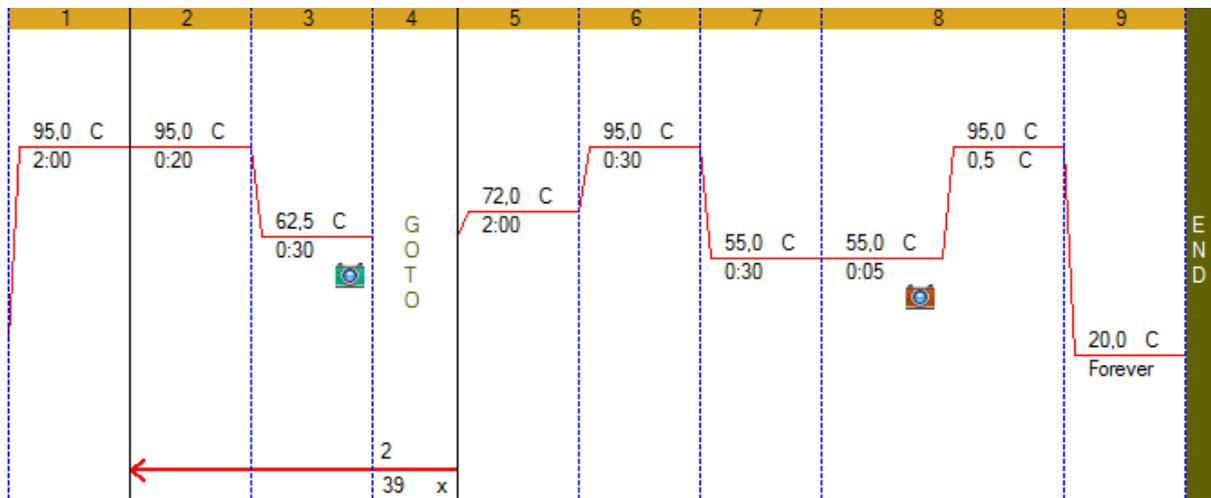


Abbildung 4: Cycler-Protokoll *iCycler*.

Nach dem Schritt der initialen Denaturierung (1+2, 2:20min bei 95°C) folgten Primeranlagerung und Elongation (3, 0:30min bei 62,5°C). Daraufhin wurde die Fluoreszenz registriert (Zeitpunkt durch Fotoapparat markiert). Die Abfolge Denaturierung (2, allerdings nur für 0:20min), Primeranlagerung, Elongation und Fluoreszenzmessung wurden vierzig Mal wiederholt. Final wurde eine Schmelzkurvenanalyse unter Temperaturerhöhung von 55°C auf 95°C durchgeführt.

Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Primerspezifität wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Ziel der Gelelektrophorese ist es, die in der *qPCR* entstandenen Produkte in einem Agarosegel aufzutrennen und mittels Ethidium Bromid sichtbar zu machen. Durch negative Ladung sowie unterschiedliche Produktgröße, werden die Produkte im Agarosegitter räumlich getrennt. Ist die Primerspezifität gegeben, wird nur ein Produkt sichtbar. Aus Agarose, Ethidium Bromid und TBE-Puffer wurde ein 3%-Agarosegel gegossen. Hierzu wurden 6g Agarose, in 500ml 0,5%-TBE-Puffer gelöst und erhitzt bis eine klare Masse entstand. Nach Abkühlen der Masse auf ca. 80°C wurden 70µl Ethidium Bromid hinzugegeben und das Gel in die vorbereitete Kammer gegeben. Nach Erkalten des Gels wurden 8µl des mit Ladungs-Puffer (2µl pro Vertiefung) versetzten *PCR*-Produkts geladen.

Zusätzlich wurde ein Standard mit bekannten *PCR* Produktgrößen pipettiert. Bei 120V (konstant) lief das Gel ca. 40min. Unter UV-Licht wurden die Banden detektiert.

Datenanalyse

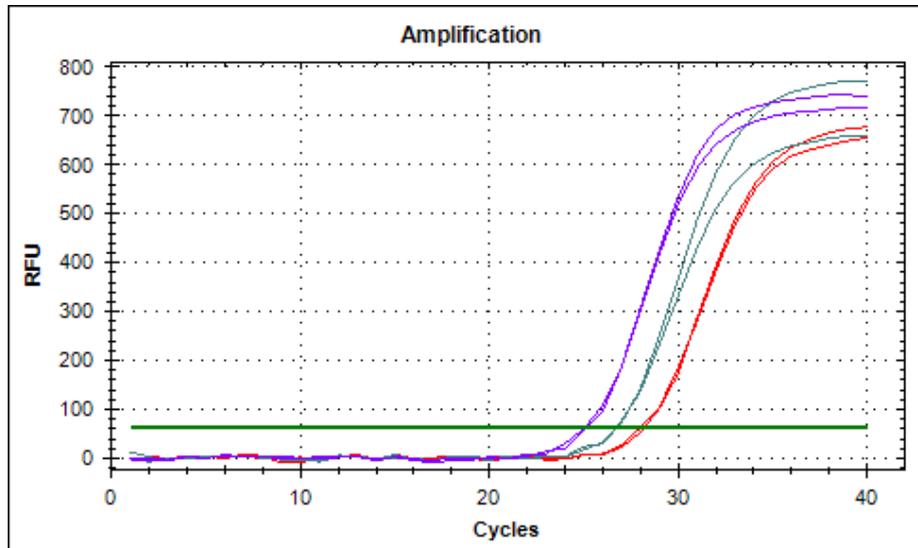


Abbildung 5: Fluoreszenzdetektion in Abhängigkeit der Zyklen.

Abbildung 5 stellt die Fluoreszenzdetektion während der *qPCR* dar. Auf der X-Achse wird die Anzahl der Zyklen angegeben, auf der Y-Achse die Fluoreszenz. Steigt die Fluoreszenz erstmalig über den Hintergrundwert an, wird der CT-Wert erfasst, welcher mit der zuvor enthaltenen cDNA-Konzentration korreliert. Die grüne Linie markiert diesen Schwellenwert und kann manuell variiert werden. Sie sollte zu Beginn der exponentiellen Phase liegen. In der exponentiellen Phase steigt die Fluoreszenz exponentiell zur Vervielfältigung der cDNA. Ist die Plateauphase erreicht, können aus der Fluoreszenz keine Rückschlüsse auf die cDNA-Menge mehr gezogen werden.

Eine hohe Gen-Expression führt zu einem niedrigen CT-Wert, da eine hohe cDNA-Konzentration zu einem schnellen Anstieg der Fluoreszenz führt. Dies muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Schmelzkurvenanalyse

Wie bereits erwähnt führt der *iCycler*® zu Ende der *qPCR* eine Schmelzkurvenanalyse durch, indem er die Temperatur schrittweise von 55°C auf 95°C erhöht und die Fluoreszenz misst. Diese Schmelzkurvenanalyse dient im Nachhinein der Kontrolle der Primerspezifität.

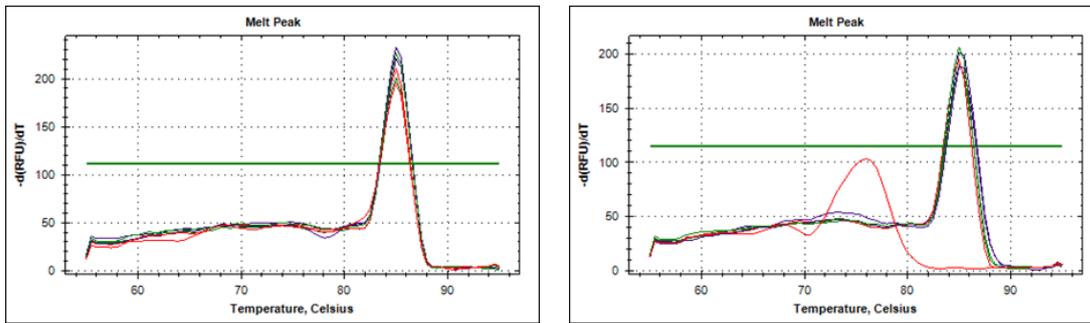


Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse. Links: spezifische Primer und dadurch nur ein Schmelzpunkt. Rechts: Verunreinigung und dadurch zweigipflige Schmelzkurve.

In Abbildung 6 ist auf der linken Seite eine Schmelzkurvenanalyse dargestellt, die in allen Vertiefungen eine identische Schmelzkurve beschreibt. Hier wurde jeweils nur ein *PCR*-Produkt detektiert. Dies spricht in Zusammenschau mit der Gelelektrophorese für Primerspezifität. Im Gegensatz dazu wird auf der rechten Seite eine Schmelzkurvenanalyse gezeigt, bei der in einer Vertiefung eine veränderte Schmelzkurve auffällt. Diese Schmelzkurve identifiziert ein weiteres *PCR*-Produkt, welches entweder auf Verunreinigung oder einen falschen Primer in einer der Proben hindeutet. Messungen mit entsprechenden Schmelzkurven wurden wiederholt.

4.5 Zytokinmessung

Die quantitative Zytokinbestimmung im Überstand (siehe Isolation & Stimulation) erfolgte mittels des *Bio-Plex[®] Multiplex Immunoassay System* und *xMAP*-Technologie lizenziert durch *LUMINEX* nach Protokoll. Das *Bio-Plex[®] Multiplex Immunoassay System* arbeitet mit fluoreszierenden *Beads*, die an Antikörper gebunden sind. Über Durchflusszytometrie und den Einsatz zweier unterschiedlicher Laser im *LUMINEX* können, mithilfe von genormten Standards, mehrere Zytokine in einer Probe gemessen werden. Nach der Messung erfolgte eine Qualitätskontrolle, wobei Messungen unter 30 gemessenen *Beads* ausgeschlossen wurden. Die unteren Nachweisgrenzen (pg/ml) der Zytokine betragen 0.09 (IL-1 β), 2.29 (IL-1 α), 0.09 (IL-18), 0.16 (IL-5), 1.59 (INF γ), 0.37 (TNF- α).

4.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mittels *R*, *SPSS* und *GraphPad Prism 8* durchgeführt.

Die epidemiologischen Daten wurden für die Studienpopulation mittels Mann-Whitney-U-Test und χ^2 -Test kalkuliert. Zusätzlich wurde bezüglich möglicher Störfaktoren (*confounder*) eine Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der *qPCR* wurden in Excel exportiert und bzgl. ihrer Qualität untersucht. So wurde die Differenz der Duplikate betrachtet, betrug die Abweichung $>0,4$, bzw. $>0,5$ bei IL-1 β , IL-18 und IL-1 α , wurden die Messungen ausgeschlossen und wiederholt. Endgültig ausgeschlossen wurden Ergebnisse, die wiederholt nicht den Qualitätsansprüchen genügten oder als Ausreißer definiert wurden. Ausreißer lagen außerhalb des Bereichs der 75-Perzentile plus dem dreifachen Interquartilsabstand. Ein nicht detektierbarer CT-Wert wurde als 40, also als die maximale Zykluszahl festgelegt. Zur statistischen Analyse wurde die relative Quantifizierung der $\Delta\Delta CT$ -Methode angewendet.

Hierbei wurde jede Genaktivität zunächst auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes *Housekeeping*-Gen normalisiert. In diesem Fall wurde 18S verwendet, die RNA der 40S-Untereinheit des Ribosoms. ΔCT bezeichnet die normalisierten Werte.

$$\Delta CT = CT\text{-Wert}_{\text{Zielgen}} - CT\text{-Wert}_{18S}$$

Als nächster Schritt wurde der Stimulationseffekt näher betrachtet. Hierfür wird der ΔCT -Wert auf den ΔCT -Wert der unstimulierten Kontrolle (Media) normalisiert.

$$fc = \Delta\Delta CT = \Delta CT\text{-Wert}_{\text{Stimulation}} - \Delta CT\text{-Wert}_{\text{Kontrolle}}$$

Weiterhin ist zu statistischen Auswertung hinzuzufügen, dass unter den Umständen dieser explorativen Studie die p-Werte nicht für multiples Testen angepasst wurden, d. h. es werden nominale p-Werte angegeben. Folglich sollten die p-Werte nicht eindeutig schlüssig interpretiert werden, sondern ein zusätzliches Instrument darstellen, inwieweit die vorliegenden Daten einige einfache Nullhypothesen stützen.

5 Ergebnisse

5.1 Charakteristika der Studien-Kohorte

Insgesamt wurden n=67 Kinder im Alter von 4-14 Jahren für die Studienkohorte rekrutiert. Alle Kinder wurden ärztlich untersucht, mittels Fragebogens wurden anamnestische Daten erhoben und es erfolgte eine Blutabnahme. Aufgrund von mangelndem Blutvolumen, Hämolyse oder anderen technischen Problemen wurden n=10 Kinder ausgeschlossen. Kinder, die klinisch und in der Anamnese keine allergischen bzw. asthmatischen Symptome aufwiesen, laborparametrisch aber eine Sensibilisierung zeigten (allg. IgE > 200IU/ml, spezifisches IgE positiv und/oder eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut) wurden als "Sensibilisierung ohne Allergie oder Asthma" klassifiziert und nicht in die Auswertung mit einbezogen (n=8). Kinder, bei denen die Diagnose allergisches Asthma bis zur Analyse der Daten nicht eindeutig bestätigt werden konnte, wurden als "allergisches Asthma unsicher" klassifiziert und ebenfalls ausgeschlossen (n=3). Mittels ärztlicher Diagnose, Fragebogen, klinischer und laborchemischer Beurteilung sowie der Lungenfunktion (soweit vorhanden) wurden insgesamt n=21 Fälle als steroidnaive "allergische Asthmatiker" (AA) und n=25 Fälle als "gesunde Kontrollen" (GK) definiert. Einen Überblick über die eingeschlossenen Patienten gibt Abbildung 7.

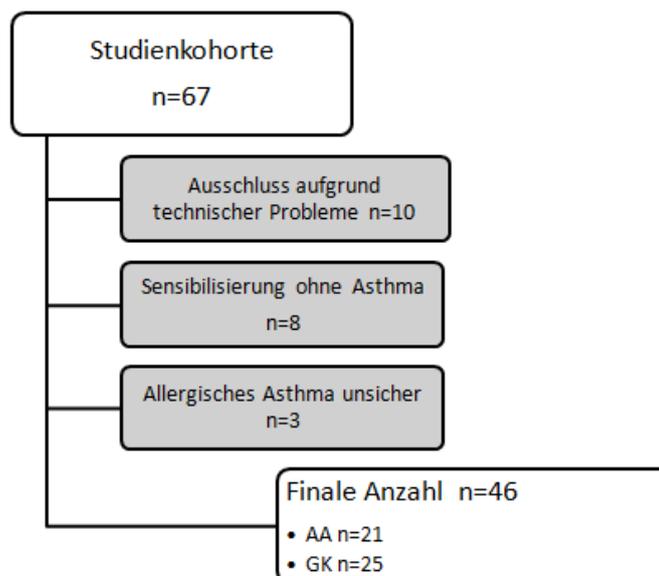


Abbildung 7: Darstellung der Studienkohorte mit Ausschlüssen. n, Anzahl der Fälle. AA, Allergische Asthmatiker. GK, gesunde Kontrollen.

Klinische Daten

Die Gruppe der allergischen Asthmatiker und gesunden Kontrollen unterschieden sich signifikant in Geschlecht, prozentualem Anteil der eosinophilen Granulozyten sowie im Gesamt- und spezifischem IgE.

Parameter	GK (n = 25) Median	AA (n = 21) Median	p- Wert
Weibliches Geschlecht, n (%)	17 (68)	6 (28.6)	0.018*†
Alter (Jahre)	10.57	10.53	0.635
(Min. bis Max)	(4.04-13.59)	(4.52-13.25)	
BMI (kg/m ²)	16.76	18.11	0.361
IQR	3.98	5.01	
Leukozyten (G/L)	5.70	6.80	0.083
IQR	2.65	2.20	
neutrophile Granulozyten (%)	44.00	41.00	0.323
IQR	15.00	12.00	
Lymphozyten (%)	43.00	42.00	0.651
IQR	12.70	10.50	
Monozyten (%)	8.00	8.00	0.539
IQR	2.00	3.50	
eosinophile Granulozyten (%)	3.00	8.00	<0.001*
IQR	2.50	3.50	
Gesamt-IgE im Serum (IU/mL)	93.95	358.71	0.001*
IQR	237	644	
Spezifisches IgE			
(pos ≥ Klasse 1)			
gegen ganzjährige Allergene, n (%)	0 (0)	12 (57.14)	<0.001*†
gegen saisonale Allergene, n (%)	0 (0)	11 (52.38)	<0.001*†
gegen Nahrungsmittelallergene, n (%)	2 (8)	7 (33.33)	0.059†
gegen Tierallergene, n (%)	2 (8)	12 (57.14)	<0.001*†

Tabelle 2: Klinische Daten aller eingeschlossenen Studienpatienten mit vollständigen Angaben. Vergleich allergischer Asthmatiker (AA) und gesunder Kontrollen (GK). n, Anzahl der Fälle. Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten als Prozentsatz der Leukozyten angegeben. IU, internationale Einheiten. Angegeben sind Median und Interquartils Abstand (IQR). Abweichende Anzahl an Fäl-

len aufgrund fehlender Angaben auf den Fragebögen möglich. * $p < 0.05$. Statistische Testung mittels Mann-Whitney-U-Test oder χ^2 -Test (†).

Die Gruppen der allergischen Asthmatiker und gesunden Kontrollen unterschieden sich signifikant in Geschlecht, im prozentualen Anteil der eosinophilen Granulozyten sowie im Gesamt- und spezifischem IgE. In der Gruppe der allergischen Asthmatiker betrug der weibliche Anteil 28.6%, in der Gruppe der gesunden Kontrollen dagegen 68% ($p = 0.018$). Die Ergebnisse wurden bzgl. Geschlechtereffekten analysiert. Aufgrund fehlender Effekte wurde im Weiteren nicht für das Geschlecht adjustiert. Im Alter (10.53 Jahre vs. 10.57 Jahre) sowie im *BMI* (18.11kg/m² vs. 16.76 kg/m²) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Weiterhin zeigten sich die eosinophilen Granulozyten (prozentual am Anteil der Leukozyten) mit 8.0% zu 3.0% in der Gruppe der allergischen Asthmatiker signifikant erhöht ($p = <0.0001$). Das Gesamt-IgE präsentierte sich mit 358.71 IU/ml zu 93.95IU/ml in der Gruppe der allergischen Asthmatiker über dreimal höher als in der Vergleichsgruppe gesunder Kinder ($p = 0.001$). Das spezifische IgE gegen ganzjährige Allergene wie Schimmelpilzsporen und Hausstaubmilben, gegen saisonale Allergene wie Pflanzenpollen und gegen Tierallergene zeigte sich in der Gruppe der allergischen Asthmatiker bei signifikant mehr Kindern erhöht, als in der Vergleichsgruppe.

Sozioökonomische Daten

Parameter	GK (n = 25)	AA (n = 21)	p - Wert
mütterliche Diagnose Asthma (jemals), n (%)	2 (8.3)	4 (19)	0.396
mütterliche Diagnose Heuschnupfen (jemals), n (%)	4 (16.7)	9 (45.0)	0.086
mütterliche Diagnose allergisches Ekzem (jemals), n (%)	1 (4.2)	1 (4.8)	>0.999
väterliche Diagnose Asthma (jemals), n (%)	5 (20.8)	3 (14.3)	0.705
väterliche Diagnose Heuschnupfen (jemals), n (%)	8 (33.3)	5 (23.8)	0.709
väterliche Diagnose allergisches Ekzem (jemals), n (%)	1 (4.2)	2 (10.0)	0.583
Rauchen Zuhause, n (%)	2 (8.0)	2 (10.0)	>0.999
mütterlicher Bildungsstand			
Keinen Schulabschluss, Haupt- oder Realschulabschluss, n (%)	11 (44)	3 (14.3)	0.063
Gymnasial- oder Hochschulabschluss, n (%)	14 (56)	18 (85.7)	
väterlicher Bildungsstand			

Keinen Schulabschluss, Haupt- oder Realschulabschluss, n (%)	9 (37.5)	5 (23.8)	0.505
Gymnasial- oder Hochschulabschluss, n (%)	15 (62.5)	16 (76.2)	
Kinder mit älteren Geschwistern, n (%)	15 (62.5)	4 (21.1)	0.016*
Kinder mit jüngeren Geschwistern, n (%)	11 (45.8)	11 (55)	0.545
Kinder mit Geschwistern, n (%)	20 (83.3)	16 (84.2)	>0.999
Durchschnittliche Geschwisterzahl (Mittelwert, min bis max)	1.38 (0-3)	1.10 (0-3)	0.367 †
Stillen (überhaupt), n (%)	21 (84.0)	19 (90.5)	0.673
Stillzeit (Monate, Min bis Max)	8.5 (0-24)	12.0 (0-36)	0.151 †
Ärztliche Diagnose atopisches Ekzem, n (%)	0 (0)	11 (52.4)	<0.001*
Ärztliche Diagnose atopische Rhinokonjunktivitis, n(%)	0 (0)	12 (57.1)	<0.001*

Tabelle 3: Sozioökonomische Daten über Fragebogen erhoben. Vergleich AA und GK. Prozente wurden als angepasste Prozente angegeben, nicht beantwortete Fragen oder mit "weiß nicht" beantwortete Fragen wurden ausgeschlossen. * $p < 0.05$. statistische Testung mittels χ^2 -Test nach Pearson oder Mann-Whitney-U-Test (†)

Bezüglich der Diagnose mütterlichen Heuschnupfens konnte der Trend beobachtet werden, dass Mütter allergischer Asthmatiker öfter ($p = 0.086$, χ^2 -Test nach Pearson) die Diagnose Heuschnupfen angaben, als Mütter gesunder Kinder. In der Gruppe der allergischen Asthmatiker gaben 45.0% der Mütter an, an Heuschnupfen zu leiden, in der Gruppe der gesunden Kontrollen hingegen 16.7%. Auch in Bezug auf mütterliches Asthma gaben Mütter allergischer Asthmatiker häufiger an, selbst an Asthma zu leiden (20%), als Mütter gesunder Kinder (8.3%). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht signifikant ($p = 0.396$).

Kinder mit allergischem Asthma bekamen häufiger die ärztliche Diagnose eines atopischen Ekzems ($p = <0.001$) und einer allergischen Rhinokonjunktivitis ($p = <0.001$) gestellt. Außerdem hatten Kinder mit allergischem Asthma signifikant seltener ältere Geschwisterkinder als gesunde Kontrollen ($p = 0.016$).

52.4% der allergischen Asthmatiker zeigten irgendwann während ihres Lebens ein Ekzem, bei den gesunden Kontrollen wurde dies bei keinem Fall angegeben ($p = <0.001$). 57.1% der allergischen Asthmatiker bekamen die ärztliche Diagnose allergische Rhinokonjunktivitis gestellt ($p = <0.001$). Gesunde Kinder hatten mit 62.5% signifikant häufiger ($p = 0.016$) ältere Geschwisterkinder, als allergische Asthmatiker (21.1%). In der Frage "Geschwisterkinder überhaupt" unterschieden sich die beiden Gruppen nicht.

Auch in der durchschnittlichen Geschwisteranzahl zeigte sich mit 1.10 zu 1.38 kein signifikanter Unterschied ($p=>0.999$). Für "ältere Geschwister" wurde eine *Confounder-analyse* durchgeführt. Auch unter Berücksichtigung dieser Effekte zeigten sich keine Auswirkungen auf die hier berichteten signifikanten Ergebnisse.

Spirometrie

Die Spirometer Untersuchungen der allergischen Asthmatiker zeigten eine mittlere forcierte Einsekundenkapazität (FEV_1) von 2.05L (SD 0.69), außerdem einen mittleren Tiffenau-Index von 80.74% (SD 9.24) und damit einen mittleren z-Wert von -0.95 (SD 1.068). Weitere Ergebnisse der Spirometrie sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Lungenfunktionen der gesunden Kontrollen der Gesamtkohorte CLARA zeigten sich unauffällig [15].

Parameter	Mittelwert	SD	Mittelwert Prozent von Soll
Forcierte Vitalkapazität (FVC) in L	2.58	0.9277	100.3
Vitalkapazität (VC) in L	2.41	0.8608	90.82
Forcierte Einsekundenkapazität (FEV_1) in L	2.05	0.6853	94.97
z-Wert FEV_1	-0.55	1.187	
Tiffenau-Index (FEV_1/FVC) in %	80.74	9.236	
z-Wert	-0.95	1.068	
<i>Peak-flow (PEF)</i> in L/s	4.01	1.384	83.75
Maximaler expiratorischer Fluss bei 25% der Vitalkapazität (FEF_{25}) in L/s	3.65	1.356	85.57
Maximaler expiratorischer Fluss bei 50% der Vitalkapazität (FEF_{50}) in L/s	2.32	0.8575	82.64
Maximaler expiratorischer Fluss bei 75% der Vitalkapazität (FEF_{75}) in L/s	1.05	0.3822	76.74

Tabelle 4: Deskriptive Statistik der Spirometer Untersuchung der allergischen Asthmatiker, n=20 (n=1, fehlende Angaben). Sollwerte altersabhängig, "Mittelwert Prozent von

Soll" bezieht sich auf den Mittelwert der Prozente vom jeweils altersentsprechendem Sollwert.

Vergleich zur Studienkohorte CLARA

Zwischen der hier gezeigten Kohorte und der Gesamtkohorte CLARA wurde ein Vergleich durchgeführt. Die beiden Studienkohorten unterscheiden sich signifikant in der Anzahl der Monate, die die allergischen Asthmatiker im Durchschnitt gestillt wurden. Die allergischen Asthmatiker der Gesamtkohorte CLARA wurden durchschnittlich 7.5 Monate gestillt und die allergischen Asthmatiker der hier gezeigten Population 12.8 Monate ($p = 0.018$). Weiterhin unterschieden sich die beiden Populationen im Anteil der weiblichen Probanden an den gesunden Kontrollen. In der Gesamtkohorte CLARA findet sich in der Gruppe der gesunden Kontrollen ein Anteil von 43.8% weiblichen Probanden, in der hier gezeigten Population 68.0 % ($p = 0.041$). Es bestanden keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen der Gesamtkohorte CLARA und der Teilpopulation [15].

5.2 PCR-Ergebnisse

5.2.1 Überblick über die Genexpression

Ausschlüsse

Tabelle 5 zeigt alle ausgeschlossenen Messungen nach Gen und Stimulus zusammengefasst. Ausgeschlossen wurden Ergebnisse, die wiederholt nicht den Qualitätsansprüchen genügten (siehe Methoden). Insgesamt mussten bei keinem der Gene und Stimuli mehr als 13% der Werte ausgeschlossen werden, im Großteil deutlich weniger (Tab. 5). Die Gene zeigten sich kongruent in ihrem Verhalten, keines der Gene zeigte auffällig mehr Ausschlüsse als andere Gene.

	Stimulus						
	G n (%)	Fi n (%)	Ch n (%)	Am n (%)	LPS n (%)	Anti CD3/ CD28 n (%)	M n (%)
<i>LMP2</i>	3 (6.5)	1 (2.2)	1 (2.2)	1 (2.2)	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)
<i>LMP7</i>	1 (2.2)	1 (2.2)	2 (4.3)	0 (0)	1 (2.2)	1 (2.2)	3 (6.5)
<i>MECL1</i>	1 (2.2)	1 (2.2)	2 (4.3)	1 (2.2)	1 (2.2)	1 (2.2)	2 (4.3)
<i>PSMA3</i>	1 (2.2)	1 (2.2)	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)
<i>TAP2</i>	4 (8.7)	2 (4.3)	2 (4.3)	2 (4.3)	1 (2.2)	1 (2.2)	3 (6.5)
<i>NLRP3</i>	3 (6.5)	0 (0)	2 (4.3)	6 (13.0)	1 (2.2)	2 (4.3)	5 (10.9)
<i>CASP1</i>	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)	0 (0)	2 (4.3)	2 (4.3)
<i>CASP4</i>	1 (2.2)	0 (0)	2 (4.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6.5)
<i>IL-1β</i>	1 (2.2)	0 (0)	2 (4.3)	0 (0)	0 (0)	1 (2.2)	2 (4.3)
<i>IL-1α</i>	2 (4.3)	0 (0)	2 (4.3)	0 (0)	0 (0)	2 (4.3)	6 (13.0)
<i>IL-18</i>	2 (4.3)	1 (2.2)	1 (2.2)	1 (2.2)	3 (6.5)	2 (4.3)	2 (4.3)

Tabelle 5: Ausschlüsse aufgrund mangelhafter Qualität der Messungen. n, Anzahl der Fälle. Stimulation durch Staubextrakte, gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). LPS, Lipopolysaccharid. M, Medium, kein Stimulus zugesetzt.

Genexpressions-Level

Die Genexpression aller auf *18S* normalisierten Gene wird in Abbildung 8 dargestellt. Durch die Messmethode der *qRT-PCR* bedeutet ein höherer Δ CT-Wert eine niedrigere Genexpression, dies erklärt die reverse Darstellung der Y-Achse. *Interleukin 1 β* (*IL-1 β*),

Interleukin 18 (IL-18) und *Interleukin 1α (IL-1α)* zeigten die größte Varianz. Die Stimulation der *PBMCs* mit den Staubextrakten führte zu einer deutlichen Veränderung der Genexpression der Interleukine (siehe unten). Dies erklärt die große Varianz in Abbildung 8, die alle Δ CT-Werte, sowohl nach, als auch vor Stimulation zusammenfasst.

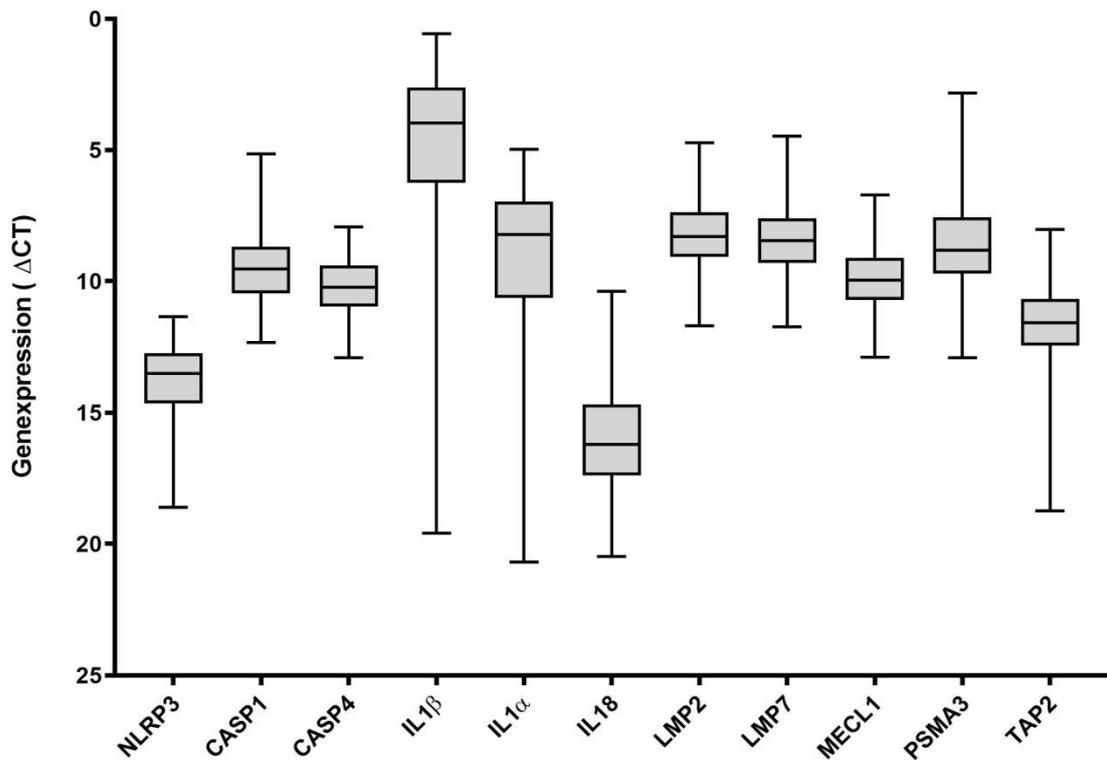


Abbildung 8: Überblick über die auf *18S* normalisierten Genexpressionen aller gemessenen Gene und aller Stimulationsbedingungen. Gemessen in *PBMCs* aller Studienpatienten (AA und GK, n = 46), mittels *RTq-PCR*. Boxplots zeigen Median und Interquartilen Abstand (IQR) der Δ CT-Werte. Die Endpunkte der Boxplots zeigen Min und Max.

5.2.2 Genexpression des Immunoproteasoms

Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen zeigten keine Unterschiede in der Genexpression der Marker des Immunoproteasoms und Proteasoms.

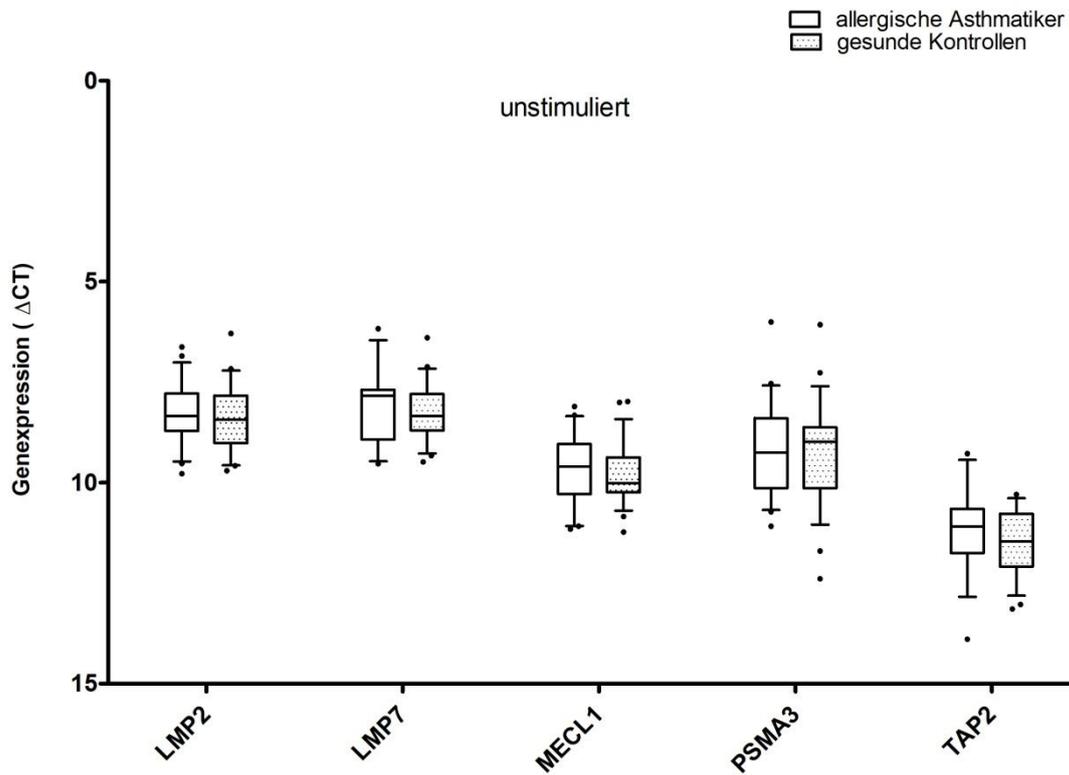
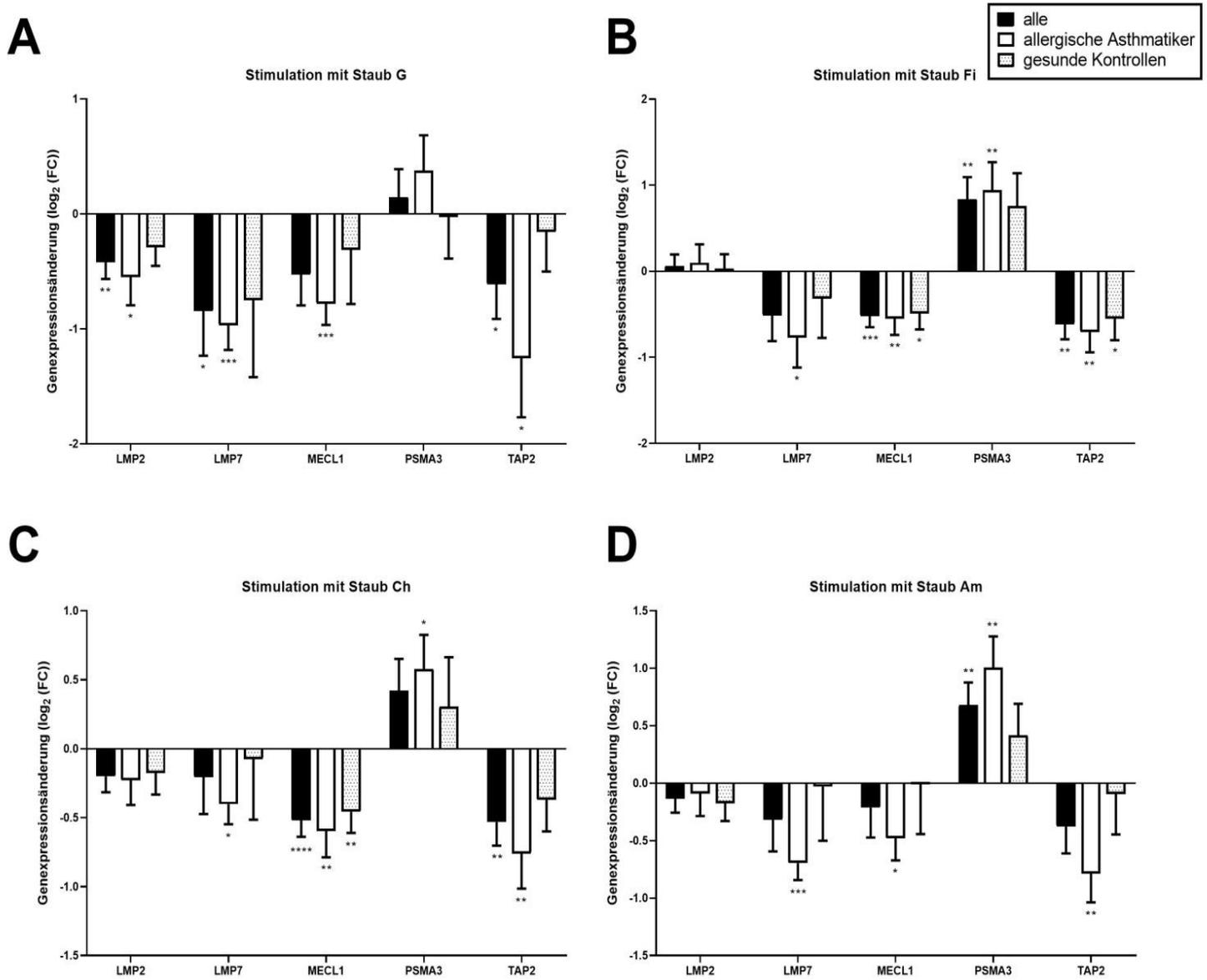


Abbildung 9: Genexpression der Marker des Immunproteasoms und Proteasoms, unstimuliert. Vergleich AA und GK. Gemessen in *PBMCs*. Normalisierte Genexpression auf *18S*. Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, ließ sich basal kein Unterschied in der Genexpression der katalytischen Einheiten des Immunproteasoms (*LMP2*, *LMP7*, *MECL1*) und den weiteren untersuchten Genen *PSMA3* und *TAP2* zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen detektieren.

Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer Reduktion der Genexpression der ausgewählten Marker des Immunoproteasoms sowie mit einer Steigerung der Genexpression der Marker des Proteasoms assoziiert.



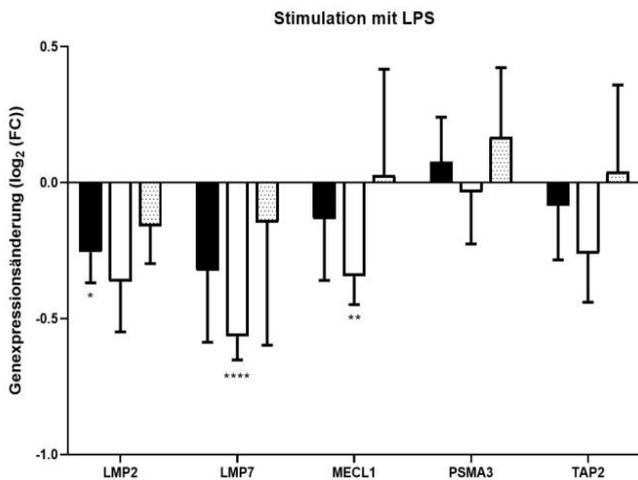
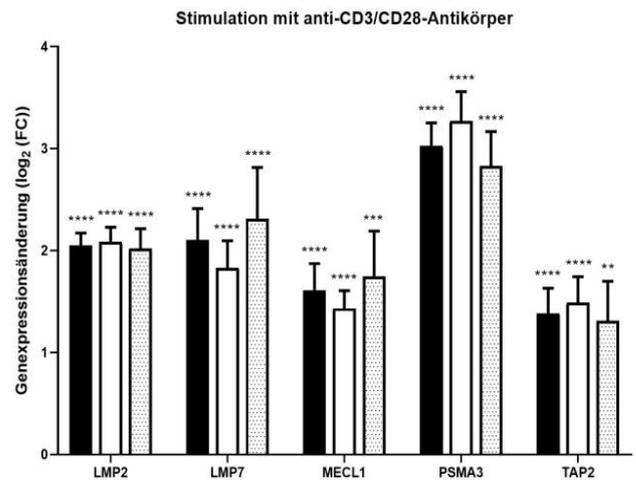
E**F**

Abbildung 10: A-F: Genexpression der Marker des Immunproteasoms und Proteasoms nach Stimulation. Gemessen in *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. A: Stimulation mit einem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (G). B: Stimulation mit einem auf einem finnischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Fi). C: Stimulation mit einem auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Ch). D: Stimulation mit einem bei den Amischen gewonnenen Staubextrakt (Am). E; Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), F: Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörper. *FC*; *fold change*. Balkendiagramme, Mittelwert mit SEM. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

In Abbildung 10 werden die, mit der Stimulation mit den Staubextrakten assoziierten Änderungen der Genexpression dargestellt. Die Balken zeigen die relative Veränderungen zur unstimulierten Kontrolle, eine negativer *Fold change* bedeutet eine geringere Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Die Genexpression der katalytischen Einheiten (*LMP2*, *LMP7*, *MECL1*) des Immunproteasoms zeigte sich nach Stimulation mit den verschiedenen Staubextrakten kongruent supprimiert. Betrachtet man die Gesamtheit aller Kinder (alle), war die Stimulation mit deutschem, finnischem und chinesischem Staubextrakt mit signifikanten Änderungen assoziiert (siehe Tabelle 6). Weiterhin wurde die Studienkohorte in "allergische Asthmatiker" und "gesunde Kontrollen" unterteilt. Sowohl in der Gruppe der allergischen Asthmatiker, als auch in der Gruppe der gesunden Kontrollen, war die Stimulation mit den Staubextrakten mit einer Suppression der Expression der katalytischen Einheiten des Immunproteasoms assoziiert. **Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen nicht.** In der Gruppe der allergischen Asthmatiker zeigten sich die Effekte häufiger signifikant, als in der Gruppe der gesunden Kontrollen. Bei den gesunden Kontrollen war die Stimulation

mit Staubextrakten in drei Fällen (*MECL1* Stimulus Fi, *TAP2* Stimulus Fi, *MECL1* Stimulus Ch) mit signifikanten Änderungen assoziiert. In der Gruppe der allergischen Asthmatiker kam es, trotz weniger Studienpatienten, in 16 Kombinationen aus Gen und Stimulus zu signifikanten Änderungen (Tabelle 6). Weiterhin war die Stimulation mit den Staubextrakten mit einer Reduktion der *TAP2* Genexpression assoziiert. Signifikante Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen zeigten sich auch hier nicht. Im Gegensatz zu den katalytischen Untereinheiten des Immunoproteasoms, war die Stimulation mit finnischem und amischem Staubextrakt mit einer signifikanten Erhöhung der *PSMA3* Genexpression assoziiert (Tabelle 6).

Phänotyp	Gen	Stimulus	mittlere Genexpressionsänderung (FC)	p-Wert
AA	<i>LMP2</i>	G	-0.55	0.04 *
AA	<i>LMP7</i>	G	-0.97	0.0003 ***
AA	<i>LMP7</i>	Fi	-0.77	0.04 *
AA	<i>LMP7</i>	CH	-0.40	0.01 *
AA	<i>LMP7</i>	Am	-0.69	0.0002 ***
AA	<i>MECL1</i>	G	-0.78	0.0004 ***
AA	<i>MECL1</i>	Fi	-0.55	0.01 *
AA	<i>MECL1</i>	CH	-0.60	0.006 **
AA	<i>MECL1</i>	Am	-0.48	0.02 *
AA	<i>PSMA3</i>	Fi	0.94	0.009 **
AA	<i>PSMA3</i>	CH	0.58	0.03 *
AA	<i>PSMA3</i>	Am	1.01	0.001 **
AA	<i>TAP2</i>	G	-1.25	0.03 *
AA	<i>TAP2</i>	Fi	-0.70	0.009 **
AA	<i>TAP2</i>	CH	-0.76	0.009 **
GK	<i>MECL1</i>	Fi	-0.49	0.01 *
GK	<i>MECL1</i>	CH	-0.46	0.007 **
GK	<i>TAP2</i>	Fi	-0.55	0.04 *

Tabelle 6: Änderung der Genexpression der Marker des Immunoproteasoms und Proteasoms durch Stimulation. Gemessen in *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation durch Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). *FC*; *fold change*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Darstellung nur signifikanter Änderungen, vollständige Darstellung siehe Anhang Tabelle 17)

Betrachtet man die Positivkontrollen Lipopolysaccharid (LPS) und anti-CD3/CD28-Antikörper, so fällt auf, dass **LPS und die Staubextrakte einen ähnlichen Effekt zeigten**. Auch hier wurden *LMP2* (mittlere Änderung: -0.26, $p = 0.029$), *LMP7* (AA, mittlere Änderung: -0.57, $p = < 0.0001$) und *MECL1* (AA, mittlere Änderung: -0.34, $p = 0.004$) supprimiert. Bei *PSMA3* (*ns*) und *TAP2* (*ns*) zeigten sich keine signifikanten Effekte. Stimulation mit Anti-CD3/CD28-Antikörper war mit einer signifikanten Steigerung der Genexpression der katalytischen Einheiten des Immunoproteasoms sowie *PSMA3* und *TAP2* assoziiert. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen.

Stimulation mit dem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenem Staubextrakt war im Vergleich zu den übrigen Staubextrakten mit der größten Veränderung der Genexpression assoziiert.

Gen	Stimulus 1	Stimulus 2	p-Wert	mittlere Änderung Stimulus 1 (FC)	mittlere Änderung Stimulus 2 (FC)	Differenz (Stimulus1-Stimulus2)
<i>LMP2</i>	Fi	G	<0.001 ****	0.0623	-0.4194	0.5149
<i>LMP2</i>	CH	G	0.0254 *	-0.200	-0.4194	0.2982
<i>LMP2</i>	Am	G	0.0093**	-0.1352	-0.4194	0.3148
<i>LMP7</i>	Fi	G	0.2807	-0.5139	-0.8452	0.3312
<i>LMP7</i>	CH	G	0.0159 *	-0.2070	-0.8452	0.6408
<i>LMP7</i>	Am	G	0.0637 Trend	-0.3172	-0.8452	0.5279
<i>MECL1</i>	Fi	G	0.0367 *	-0.5184	-0.5246	0.2313
<i>MECL1</i>	CH	G	0.0592 Trend	-0.5193	-0.5246	0.2628
<i>MECL1</i>	Am	G	0.0027 **	-0.2129	-0.5246	0.3192

Tabelle 7: Vergleich der Änderung der Genexpression (FC logSkala) durch die Staubextrakte. Stimulation durch Staubextrakte, gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Kohorte gesamt, n=46. Statistische Testung mittels t-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Stimulation mit dem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenem Staubextrakt war mit einer stärkeren Suppression der Genexpression der katalytischen Einheiten des Immunoproteasoms assoziiert, als die Stimulation mit den anderen Staubextrakten (siehe Tabelle 7).

5.2.3 Genexpression des Inflammasoms

Allergische Asthmatiker zeigten eine höhere Interleukin 18-, sowie geringere Interleukin 1 β - und Interleukin 1 α -Genexpression als gesunde Kinder.

Die basale Genexpression von Teilen des Inflammasomsignalweges unterschied sich signifikant zwischen gesunden Kontrollen und allergischen Asthmatikern (Abbildung 11). Allergische Asthmatiker zeigten eine signifikant niedrigere *Interleukin 1 β* (*IL-1 β* , Δ CT: 10.51 vs. 8.10, $p = 0.01$) und *Interleukin 1 α* (*IL-1 α* , Δ CT: 15.72 vs. 12.43, $p = 0.001$) Genexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Allergische Asthmatiker zeigten außerdem eine signifikant höhere *Interleukin 18* (*IL-18*, Δ CT: 13.45 vs. 15.01, $p = 0.003$) Genexpression als gesunde Kontrollen. Bei der *NLRP3*, *CASP1* und *CASP4* Genexpression wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen detektierbar.

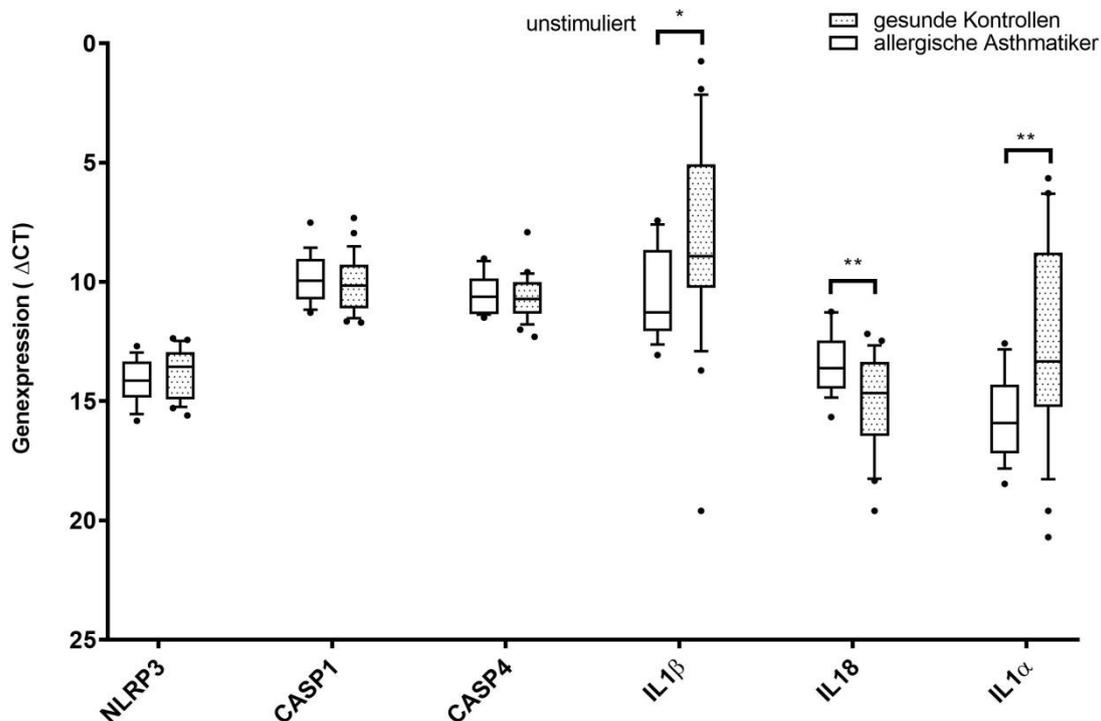


Abbildung 11: Genexpression der Marker des Inflammasoms, unstimuliert. Gemessen in *PBMCs* von gesunden Kontrollen (GK) und allergischen Asthmatikern (AA). Normalisierte Genexpression auf *18S*. Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. statistische Analyse mittels T-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer Steigerung der Genexpression der Marker des Inflammasoms assoziiert.

Die Stimulation mit dem deutschen und finnischen Staubextrakt war mit einer signifikanten Steigerung der Genexpression des *NLRP3*-Inflammasoms assoziiert. Die Stimulation mit dem chinesischen Staubextrakt war hingegen mit einer verminderten *NLRP3* Genexpression verbunden (Tabelle 8). Auch bei Stimulation mit LPS und anti-CD3/CD28-Antikörpern wurde eine Steigerung der *NLRP3* Genexpression beobachtet (alle, *NLRP3* LPS, mittlere Änderung: 0.70, $p = 0.0002$). **Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen unterschieden sich nicht in der Änderung der Genexpression des *NLRP3*-Inflammasoms bei Stimulation.**

Phänoytp	Gen	Stimulus	mittlere Gen-expressionsänderung (FC)	<i>p</i> -Wert
alle	<i>NLRP3</i>	G	0.50	0.002 **
AA	<i>NLRP3</i>	G	0.38	0.002 **
GK	<i>NLRP3</i>	G	0.60	0.03 *
alle	<i>NLRP3</i>	Fi	0.32	0.02 *
AA	<i>NLRP3</i>	Fi	0.44	0.01 *
HC	<i>NLRP3</i>	Fi	0.21	0.29 ns
alle	<i>NLRP3</i>	CH	-0.28	0.04 *
AA	<i>NLRP3</i>	CH	-0.21	0.15 ns
HC	<i>NLRP3</i>	CH	-0.34	0.12 ns
all	<i>NLRP3</i>	Am	0.20	0.08 ns
AA	<i>NLRP3</i>	Am	0.07	0.63 ns
HC	<i>NLRP3</i>	Am	0.30	0.08 ns
all	<i>NLRP3</i>	LPS	0.70	0.0002 ***
AA	<i>NLRP3</i>	LPS	0.59	0.003 **
HC	<i>NLRP3</i>	LPS	0.78	0.01 *
all	<i>NLRP3</i>	Anti-CD3/ CD28	0.40	0.07 ns
AA	<i>NLRP3</i>	Anti-CD3/ CD28	0.47	0.02 *
HC	<i>NLRP3</i>	Anti-CD3/ CD28	0.35	0.34 ns

Tabelle 8: Änderung der Genexpression des *NLRP3* Inflammasoms durch Stimulation. Gemessen in *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). *FC*; fold change. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Betrachtet man die *Caspasen 1 (CASP1)* und *4 (CASP4)*, so zeigte sich eine, bei Stimulation mit allen Staubextrakten sowie mit LPS und anti-CD3/CD28-Antikörper durchgehend erhöhte Genexpression. **Zwischen den Gruppen allergischer Asthmatiker und gesunder Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede** (Tabelle 9).

Phänotyp	Gen	Stimulus	mittlere Gen- expressionsän- derung (FC)	p-Wert
alle	<i>CASP1</i>	Fi	1.34	0.0004 ***
alle	<i>CASP4</i>	Fi	0.85	0.001 **
alle	<i>CASP1</i>	Am	0.90	0.004 **
alle	<i>CASP4</i>	Am	0.72	0.006 **
alle	<i>CASP1</i>	Anti-CD3/ CD28	1.03	0.003 **
alle	<i>CASP4</i>	Anti-CD3/ CD28	0.93	0.002 **
alle	<i>CASP1</i>	LPS	0.69	0.01 *
alle	<i>CASP4</i>	LPS	0.70	0.005 **

Tabelle 9: Änderung der Genexpression von *CASP1* und *CASP4* durch Stimulation. Gemessen in *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation mit Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). *FC*; *fold change*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Darstellung nur signifikanter Änderungen und Phänotyp "alle", weitere Werte siehe Tabelle 18 im Anhang.

Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer Steigerung der IL-1 β und IL-1 α -Genexpression sowie einer Reduktion der IL-18 Genexpression assoziiert. Allergische Asthmatiker reagierten mit stärkeren Veränderungen als gesunde Kontrollen.

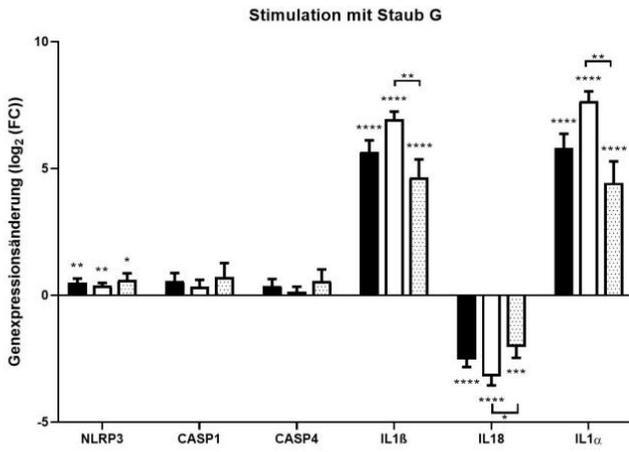
Die Stimulation mit dem deutschen, finnischen und amischen Staubextrakt ebenso wie mit LPS und anti-CD3/CD28-Antikörpern (AK) war mit einer Steigerung der *IL-1 β* Genexpression assoziiert (siehe Abbildung 12 und Tabelle 19, Anhang). Die Stimulation mit deutschen, finnischen und amischen Staubextrakten war bei den allergischen Asthmatikern mit einer signifikant stärkeren Erhöhung assoziiert als bei den gesunden Kontrollen (Abbildung 12, Tabelle 10). Auch die *IL-1 α* Genexpression war nach Stimulation mit allen Stimuli erhöht (siehe Abbildung 12 und Tabelle 19, Anhang). Auch hier zeigten die deutschen, finnischen und amischen Staubextrakte bei allergischen Asthmatikern einen stärker ausgeprägten Effekt, als bei den gesunden Kontrollen (Ab-

bildung 12, Tabelle 10). Die Stimulation mit dem deutschen, finnischen und amischen Staubextrakt sowie mit LPS und Anti-CD3/CD28-Ak war mit einer signifikanten Suppression der *IL-18* Genexpression assoziiert (siehe Abbildung 12 und Tabelle 19, Anhang). Die Suppression der *IL-18* Genexpression nach der Stimulation mit dem deutschen Staubextrakt zeigte sich bei allergischen Asthmatikern signifikant stärker, als bei gesunden Kontrollen. Bei Stimulation mit dem bei den Amischen gewonnenem Staubextrakt zeigte sich mit $p = 0.06$ ein Trend in dieselbe Richtung. Zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen bestanden weiterhin signifikante Unterschiede in der Reaktion auf LPS-Stimulation. Allergische Asthmatiker reagierten signifikant stärker auf die Stimulation mit LPS als gesunde Kontrollen (Abbildung 12, Tabelle 10). **Insgesamt konnte unter Stimulation bei allergischen Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine stärkere Erhöhung der *IL-1 β* und *IL-1 α* Genexpression und eine stärkere Suppression der *IL-18* Genexpression beobachtet werden.** Dies wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

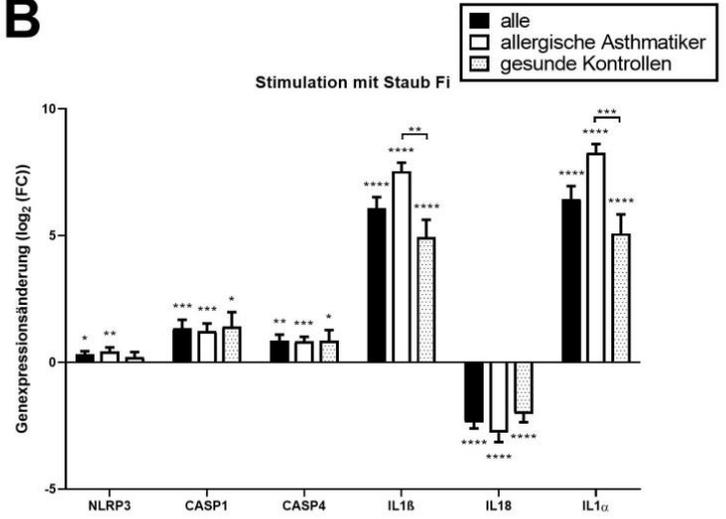
Gen	Stimulus	<i>p</i> -Wert	mittlere Genexpressionsänderung (FC) GK	mittlere Genexpressionsänderung (FC) AA
<i>IL-1β</i>	G	0.006 **	4.64	6.94
<i>IL-1β</i>	Fi	0.002 **	4.96	7.54
<i>IL-1β</i>	CH	0.23 ns	0.32	0.97
<i>IL-1β</i>	Am	0.005 **	4.84	7.18
<i>IL-1β</i>	LPS	0.009 **	5.08	7.28
<i>IL-1β</i>	Anti-CD3/ CD28	0.007 **	3.65	6.05
<i>IL-18</i>	G	0.04 *	-2.03	-3.19
<i>IL-18</i>	Fi	0.13 ns	-2.03	-2.78
<i>IL-18</i>	CH	0.77 ns	0.28	0.14
<i>IL-18</i>	Am	0.06 Trend	-1.61	-2.60
<i>IL-18</i>	LPS	0.001 **	-1.66	-3.34
<i>IL-18</i>	Anti-CD3/ CD28	0.14 ns	-1.54	-2.35
<i>IL-1α</i>	G	0.002 **	4.43	7.65
<i>IL-1α</i>	Fi	0.001 **	5.09	8.27
<i>IL-1α</i>	CH	0.06 Trend	0.38	1.56
<i>IL-1α</i>	Am	0.0001 ***	5.08	8.25
<i>IL-1α</i>	LPS	0.003 **	4.90	7.52
<i>IL-1α</i>	Anti-CD3/ CD28	0.003 **	4.15	6.93

Tabelle 10: Änderung der Genexpression *IL-1 β* , *IL-18* und *IL-1 α* durch Stimulation im Vergleich AA und GK. Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). FC; fold change. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

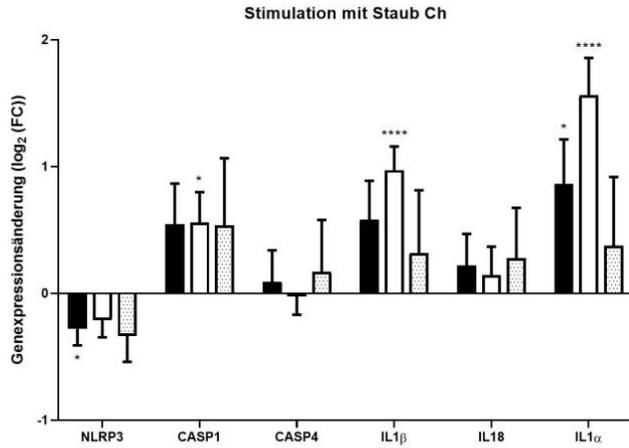
A



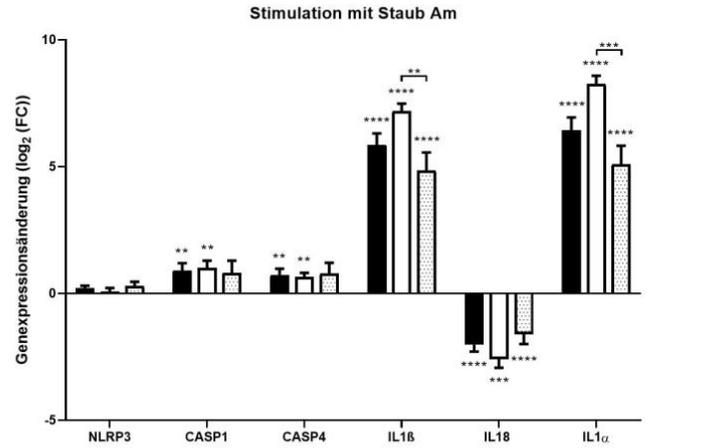
B



C



D



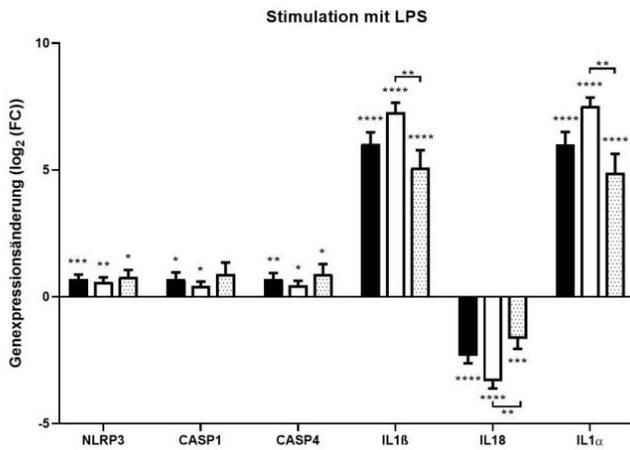
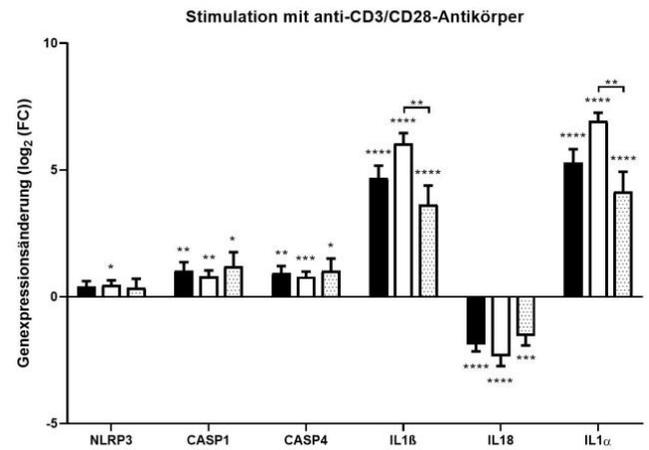
E**F**

Abbildung 12: A-F: Genexpression der Marker des Inflammasoms nach Stimulation in *PBMCs* von gesunden Kontrollen (GK) und allergischen Asthmaticern (AA). A: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G). B: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen auf einem finnischen Bauernhof (Fi). C: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen auf einem chinesischen Bauernhof (Ch). D: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen bei den Amischen (Am). E: Stimulation durch LPS, F: Stimulation durch anti-CD3/CD28-Antikörper. *FC*; fold change. Balkendiagramme, Mittelwert mit SEM. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Nach Stimulation mit den Staubextrakten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der IL-1β-, IL-18- und IL-1α-Genexpressionen zwischen allergischen Asthmaticern und gesunden Kontrollen.

Wie zuvor gezeigt, zeigte sich die Genexpression von *IL-1β* und *IL-1α* bei allergischen Asthmaticern höher exprimiert als bei gesunden Kontrollen. *IL-18* war bei allergischen Asthmaticern weniger exprimiert als bei gesunden Kontrollen. Es fiel auf, dass allergische Asthmaticer mit einer signifikant stärkeren Änderung der Genexpression auf die Stimulation mit den Staubextrakten reagierten als gesunde Kontrolle. In Abbildung 13 wird deutlich, dass die, im unstimulierten Zustand bestehenden signifikanten Unterschiede zwischen allergischen Asthmaticern und gesunden Kontrollen nach der Stimulation mit den auf einem deutschen und einem finnischen Bauernhof sowie bei den Amischen gewonnenen Staubextrakten, nicht mehr beobachtet werden können. **Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einem Angleichen der Genexpression der Interleukinen 1β, 18 und 1α zwischen allergischen Asthmaticern und gesunden Kontrollen assoziiert.**

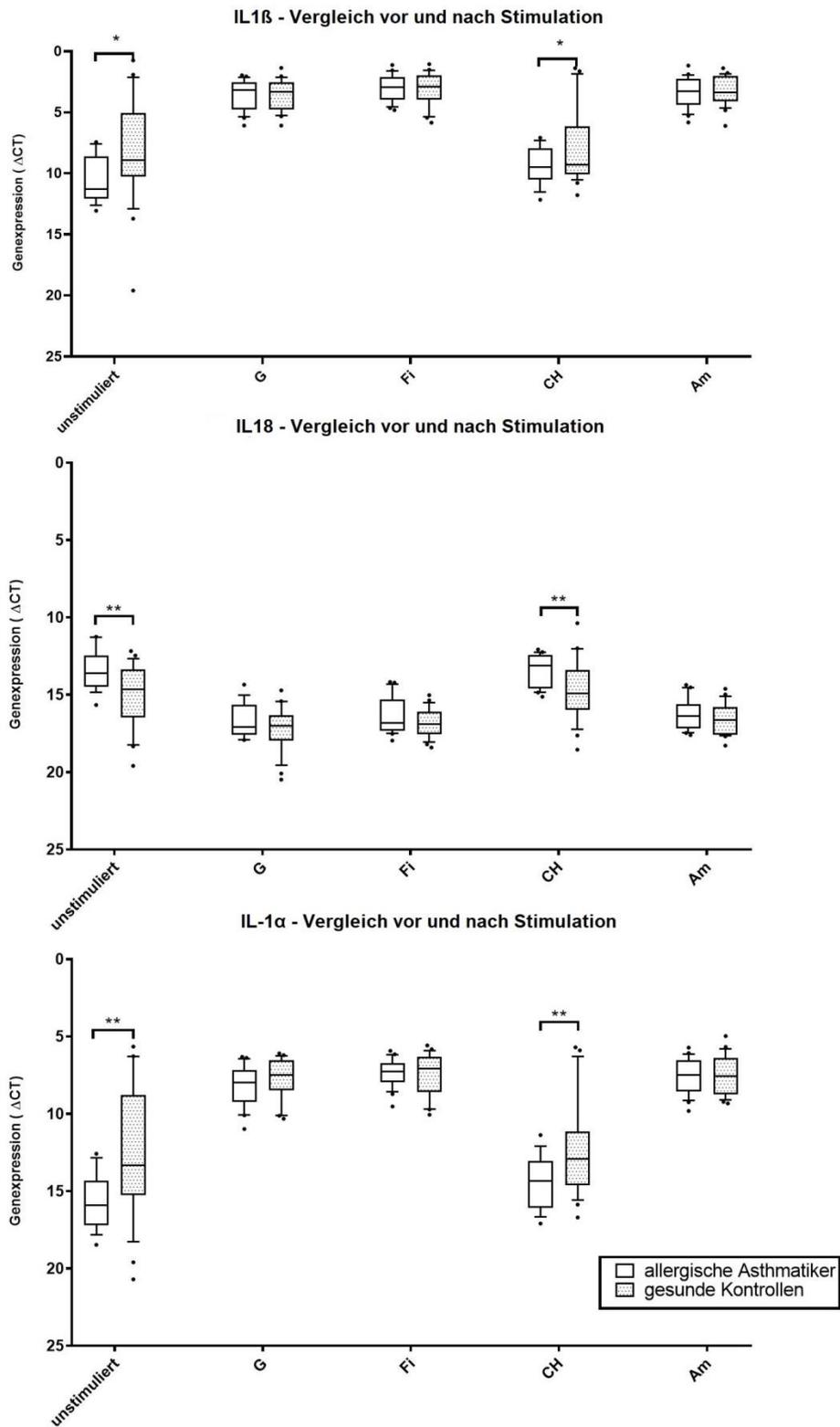


Abbildung 13: Genexpression der *Interleukine 1β*, *18* und *1α*. AA und GK im Vergleich vor und nach Stimulation mit Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Normalisierte Genexpression auf *18S*. Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Die Stimulation mit dem, auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenem Staubextrakt war mit weniger Veränderung der Genexpression assoziiert als die Stimulation mit den anderen Staubextrakten.

In Abbildung 13 wird deutlich, dass sich die Genexpression der Interleukine zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen nach Stimulation mit dem, auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenem Staubextrakt ebenso signifikant unterschieden wie bei fehlender Stimulation. Im Vergleich der verschiedenen Staubextrakte wurde deutlich, dass die Stimulation mit dem auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt mit signifikant weniger Änderung der Genexpression assoziiert war als die Stimulation mit den übrigen Staubextrakten (Tabelle 11).

Gen	Stimulus 1	mittlere Gen- expressions- änderung (FC) Stimulus 1	Stimulus 2	mittlere Gen- expressions- änderung (FC) Stimulus 2	p-Wert
<i>NLRP3</i>	G	0.3765	Ch	-0.2803	<0.0001 ****
<i>Casp1</i>	G	0.2611	Ch	0.2609	0.9994 ns
<i>Casp4</i>	G	0.1164	Ch	-0.1373	0.1237 ns
<i>IL-1β</i>	G	5.659	Ch	0.5815	<0.0001 ****
<i>IL-18</i>	G	-2.527	Ch	0.2202	<0.0001 ****
<i>IL-1α</i>	G	6.085	Ch	0.8616	<0.0001 ****
<i>NLRP3</i>	Fi	0.3169	Ch	-0.2803	0.0014 **
<i>Casp1</i>	Fi	1.038	Ch	0.2609	0.0012 **
<i>Casp4</i>	Fi	0.6403	Ch	-0.1373	<0.0001 ****
<i>IL-1β</i>	Fi	6.074	Ch	0.5815	<0.0001 ****
<i>IL-18</i>	Fi	-2.363	Ch	0.2202	<0.0001 ****
<i>IL-1α</i>	Fi	6.444	Ch	0.8616	<0.0001 ****
<i>NLRP3</i>	Am	0.1963	Ch	-0.2803	0.0063 **
<i>Casp1</i>	Am	0.6525	Ch	0.2609	0.0831 ns
<i>Casp4</i>	Am	0.4971	Ch	-0.1373	<0.0001 ****
<i>IL-1β</i>	Am	5.853	Ch	0.5815	<0.0001 ****
<i>IL-18</i>	Am	-2.022	Ch	0.2202	<0.0001 ****
<i>IL-1α</i>	Am	6.428	Ch	0.8616	<0.0001 ****

Tabelle 11: Vergleich der Änderung der Genexpression (*FC*) durch die Staubextrakte, Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Kohorte gesamt, n=46. statistische Testung mittels t-Test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001.

5.3 Zytokin-Ergebnisse

5.3.1 Überblick über die Zytokinsekretion

Ausschlüsse

	G	Fi	Am	LPS	M
	n (%)				
IL-1β	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.3)
IL-18	16 (37.2)	6 (14.0)	10 (23.3)	18 (41.9)	20 (46.6)
IL-1α	2 (4.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (11.6)	3 (7.0)
TNF α	4 (9.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (7.0)	5 (11.6)
IL-5	0 (0.0)	1 (2.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
IFN γ	1 (2.3)	2 (4.7)	3 (7.0)	2 (4.7)	0 (0.0)

Tabelle 12: Ausschlüsse der Zytokinmessungen, n=43. Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am).

Tabelle 12 zeigt die Ausschlüsse der Zytokinmessungen. Gründe für einen Ausschluss waren technische Probleme und nicht den Qualitätsansprüchen entsprechende Messungen. Bei IL-18 mussten mit 46.6% beim unstimulierten Kontrollansatz (M) die größte Menge an Messwerten ausgeschlossen werden. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Alle anderen Zytokine zeigten sich kongruent und es wurden maximal 11.2% ausgeschlossen. Es fiel auf, dass die meisten Ausschlüsse bei den unstimulierten Kontrollen (M) erfolgten (Tabelle 12).

Protein-Expression

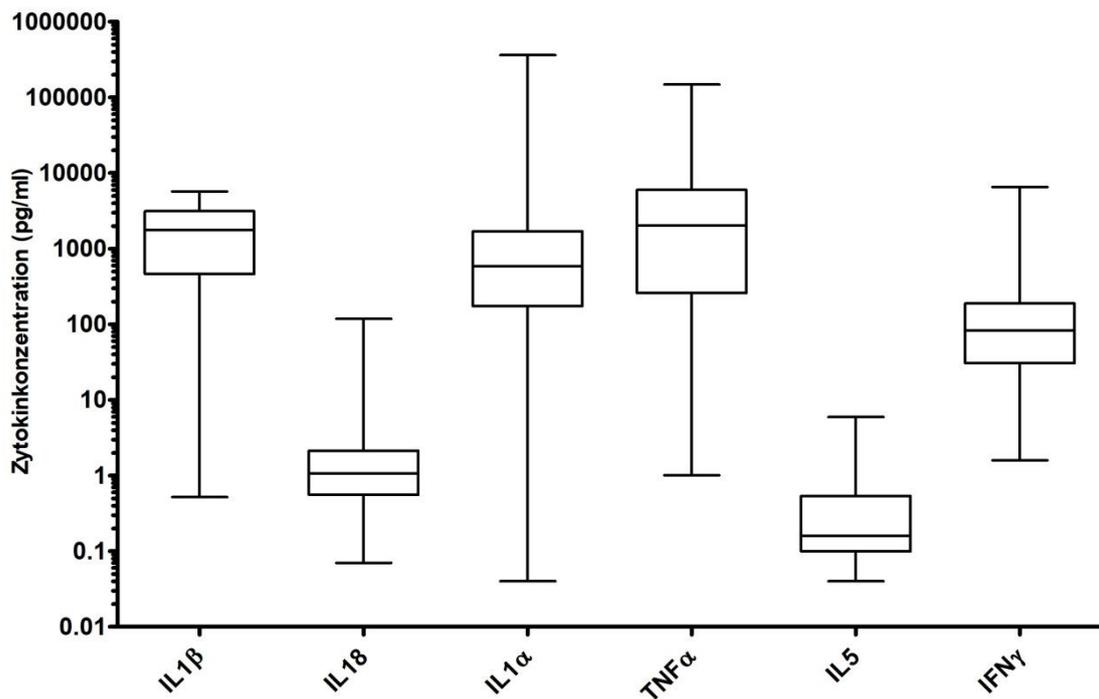


Abbildung 14: Überblick über die Zytokinkonzentration aller gemessener Zytokine und aller Stimulationsbedingungen sowie unstimuliert in pg/ml. Gemessen im Überstand von *PBMCs* aller Studienpatienten (AA und GK, n = 43), mittels Luminex-Technologie. Boxplots zeigen Median und IQR. Endpunkte der Boxplots zeigen Min und Max.

Abbildung 14 stellt die Konzentrationen der gemessenen Interleukine dar. IL-18 zeigt, neben IL-5, die niedrigste gemessene Konzentration. Es fällt auf, dass sich die minimalen Konzentrationen bei allen Interleukinen ähneln. In den Konzentrationsmaxima unterscheiden sich die Konzentrationen um bis zu sechs Zehnerpotenzen (Tabelle 13).

	IL-1β	IL-18	IL-1α	TNF α	IL-5	IFN γ
Minimum (pg/ml)	0.52	0.07	0.04	1.01	0.04	1.59
Maximum (pg/ml)	5708	118.0	362868	148116	5.95	6535
Range (pg/ml)	5707	117.9	362868	148115	5.91	6534

Tabelle 13: Überblick über die Zytokinkonzentrationen aller gemessener Zytokine. Minimum und Maximum. Range zwischen maximalem und minimalem Wert. Angabe in pg/ml.

5.3.2 Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen

PBMCs allergischer Asthmatiker sezernierten signifikant weniger IL-18 und IL-1 α als PBMCs gesunder Kontrollen.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich der sezernierten Zytokinkonzentrationen unstimulierter *PBMCs* allergischer Asthmatiker und gesunder Kontrollen. Zur erleichterten statistischen Auswertung und aufgrund der großen Streuung wurden die Interleukinkonzentrationen logarithmiert. *PBMCs* allergischer Asthmatiker sezernierten weniger IL-1 β als *PBMCs* gesunder Kontrollen (Mittlere Sekretion AA 3.31 vs. GK 4.81), jedoch zeigte sich dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0.1913$). *PBMCs* allergischer Asthmatiker sezernierten signifikant weniger IL-18 als *PBMCs* gesunder Kontrollen (Mittlere Sekretion AA -1.89 vs. GK -0.46, $p = 0.04$). Asthmatiker zeigten außerdem eine niedrigere Konzentration an IL-1 α (Mittlere Sekretion AA 3.07 vs. GK 5.240, $p = 0.01$). Bei IL-5, Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interferon γ (INF γ) ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinsekretion beobachten.

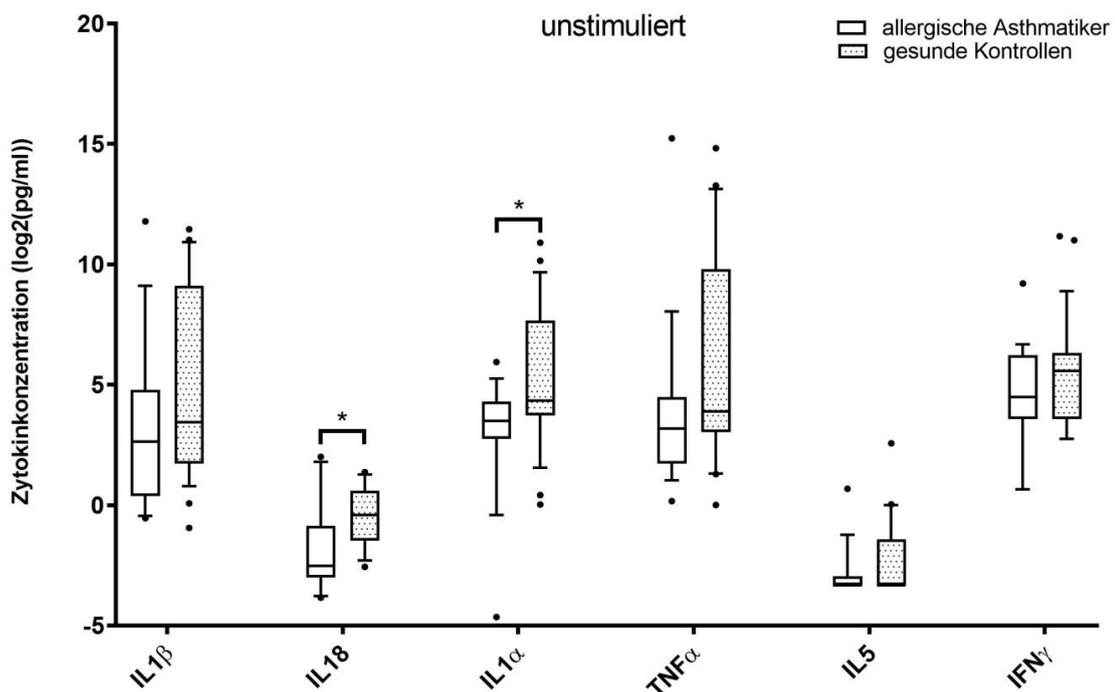


Abbildung 15: Zytokinkonzentrationen ($\log_2(\text{pg/ml})$), unstimuliert. Gemessen im Überstand von *PBMCs* gesunder Kontrollen (GK) und allergischer Asthmatiker (AA). Fallzahl variiert je nach Zytokin. GK/AA; IL-1 β (22/17); IL-18 (13/10); IL-1 α (20/17); TNF- α (20/15); INF- γ (20/13); IL-5 (7/3). Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. statistische Analyse mittels Wilcoxon-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.3.3 Korrelation der Genexpression und Zytokinsekretion

Eine erhöhte IL-1 β und IL-1 α Genexpression geht mit einer erhöhten IL-1 β und IL-1 α Zytokinsekretion einher. Eine erhöhte IL-18 Genexpression hingegen mit einer verminderten IL-18 Zytokinsekretion.

Interleukin 1 β

Betrachtet man die Korrelation der Genexpression und Zytokinsekretion von IL-1 β so gilt, je höher die *IL-1 β* - Genexpression, desto höher die IL-1 β -Zytokinsekretion ($r = 0.7110$, $p = < 0.0001$, $n = 38$). Betrachtet man die Daten nach Phänotypen getrennt, so bestand in der Gruppe der gesunden Kontrollen weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen der *IL-1 β* Genexpression und der IL-1 β Zytokinsekretion ($r = 0.8952$, $p = < 0.0001$, $n = 22$, Abbildung 16 B). In der Gruppe der allergischen Asthmatiker konnte keine signifikante Korrelation beobachtet werden ($r = 0.2900$, $p = 0.3$ nach Pearson, $p = 0.076$ nach Spearman, $n = 16$) (Abbildung 16, Vergleich B und C).

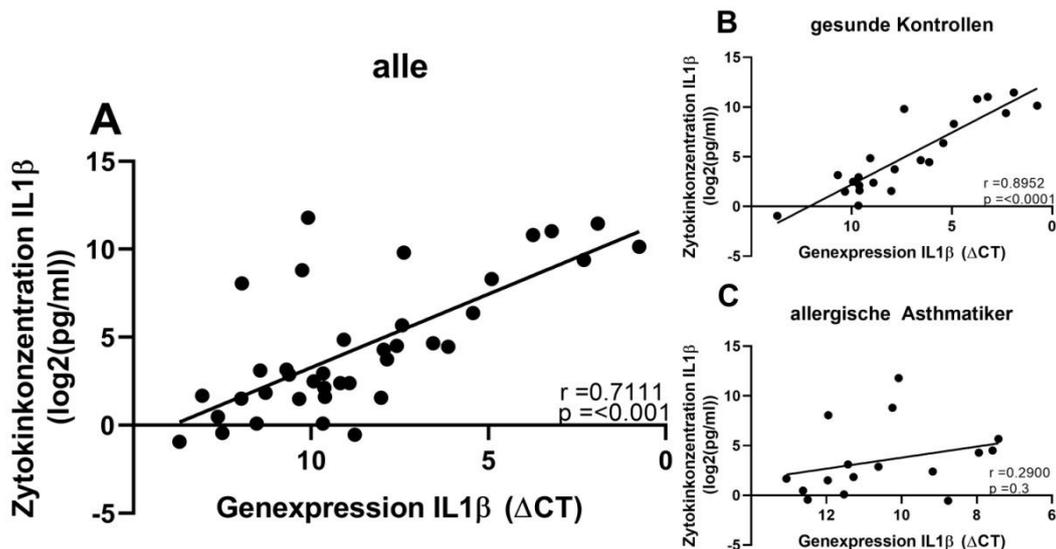


Abbildung 16: Korrelation der Genexpression (ΔCT) und Zytokinkonzentration ($\log_2(\text{pg/ml})$) von IL-1 β . A; gesamte Kohorte. B; gesunde Kontrollen. C; allergische Asthmatiker. r , Korrelationskoeffizient nach Pearson.

Interleukin 18

Die *IL-18*-Genexpression korrelierte signifikant negativ mit der IL-18-Zytokinsekretion ($r = -0.5671$, $p = 0.007$, $n = 21$). Betrachtet man die beiden Vergleichsgruppen - allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen - getrennt, so fiel auf, dass in der Gruppe der allergischen Asthmatiker keine signifikante Korrelation beobachtet werden konnte ($r = -0.1842$, $p = 0.7$, $n = 8$, Abbildung 17, C). In der Gruppe der gesunden Kontrollen konnte hingegen eine signifikante Korrelation ($r = -0.7358$, $p = 0.004$, $n = 13$, Abbildung 17, B) gezeigt werden. Hier muss die geringe Fallzahl berücksichtigt werden.

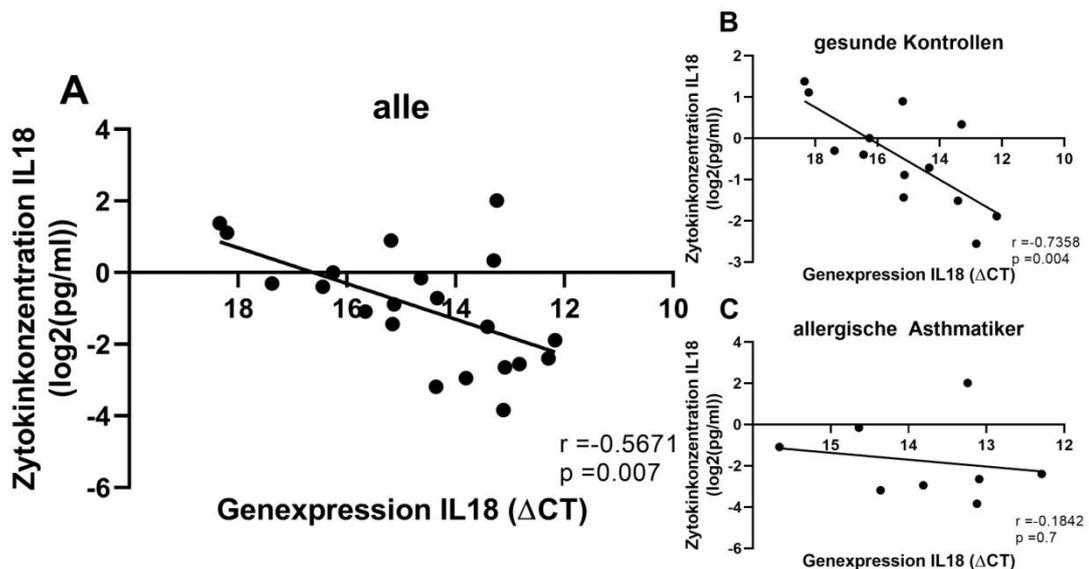


Abbildung 17: Korrelation der Genexpression und Zytokinsekretion ($\log_2(\text{pg/ml})$) von IL-18. A; gesamte Kohorte. B; gesunde Kontrollen. C; allergische Asthmatiker. r, Korrelationskoeffizient nach Pearson.

Interleukin 1 α

Die Genexpression und Zytokinsekretion des Interleukins 1 α korrelierten signifikant positiv miteinander ($r = 0.6142$, $p = 0.0001$, $n = 33$). Betrachtet man isoliert die Gruppe der gesunden Kontrollen blieb die signifikante Korrelation bestehen ($r = 0.6525$, $p = 0.002$, $n = 20$). In der Gruppe der allergischen Asthmatiker bestand keine signifikante Korrelation.

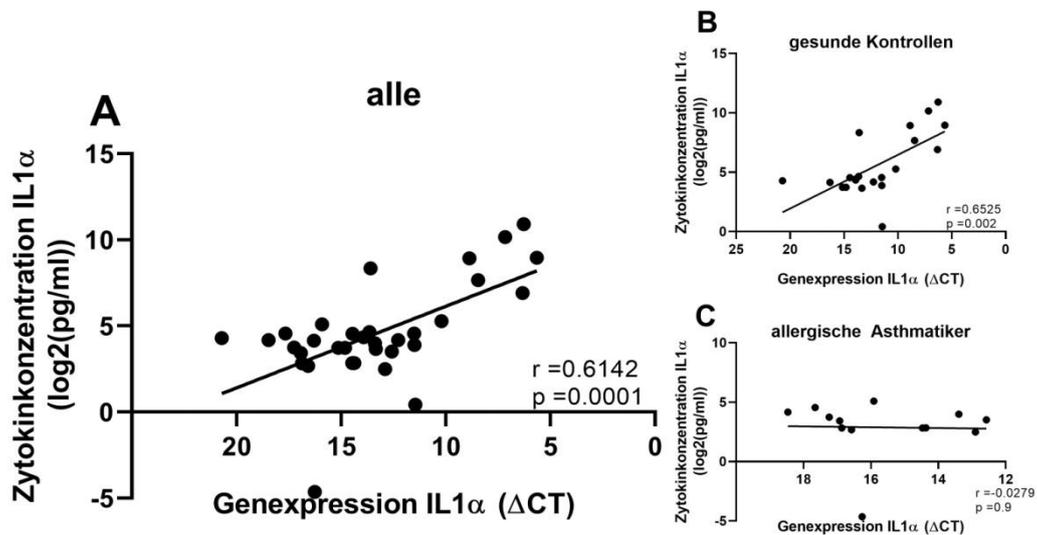


Abbildung 18: Korrelation der Genexpression und Zytokinkonzentration (log₂(pg/ml)) von IL-1 α . A; gesamte Kohorte. B; gesunde Kontrollen. C; allergische Asthmatiker. r, Korrelationskoeffizient nach Pearson.

5.3.4 Effekte der Stimulation auf die Zytokinsekretion

Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer signifikanten Steigerung der Zytokinsekretion assoziiert.

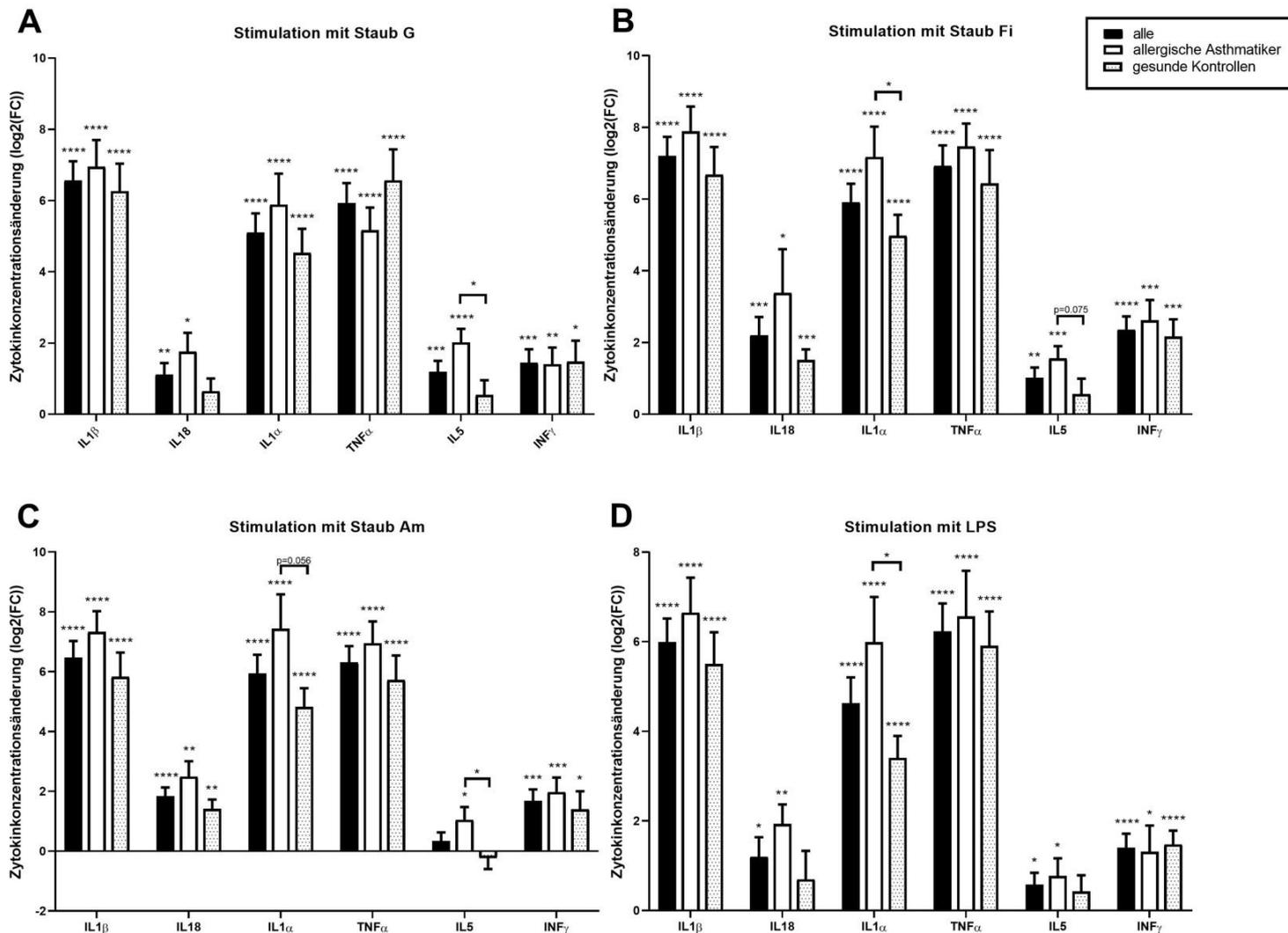


Abbildung 19: A-D: Zytokinsekretion nach Stimulation. Gemessen im Überstand *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. A: Stimulation mit einem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (G). B: Stimulation mit einem auf einem finnischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Fi). C: Stimulation mit einem auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Ch). D: Stimulation mit einem bei den Amischen gewonnenen Staubextrakt (Am). E: Stimulation mit LPS, F: Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörper. FC; fold change. Balkendiagramme, Mittelwert mit SEM. Statistische Analyse mittels T-Test. Dargestellt wird die Änderung der Sekretion durch die Stimulation der Stäube sowie der Vergleich zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen durch Klammern, „. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Wie auch die Genexpression änderte sich die Zytokinsekretion nach Stimulation mit den Staubextrakten signifikant. In der gesamten Studienkohorte (alle), als auch in den Subpopulationen allergischer Asthmatiker (AA) und gesunder Kontrollen (GK) war die

Stimulation mit den Staubextrakten mit einer signifikanten Steigerung der IL-1 β , IL-18 und IL-1 α Sekretion assoziiert (Abbildung 19, Tabelle 20, Anhang). Auch die TNF- α -, IL-5- und INF- γ - Sekretion zeigte sich, ebenso wie die Sekretion der NLRP3-Inflammasom abhängigen Interleukine, nach Stimulation mit den Staubextrakten signifikant erhöht (Abbildung 19, Tabelle 20, Anhang).

Allergische Asthmatiker reagierten mit einer signifikant stärkeren IL-1 α - und IL-5-Sekretion auf die Stimulation mit den Staubextrakten als gesunde Kontrollen.

Wie in Abbildung 19 deutlich wird, reagierte die Gruppe der allergischen Asthmatiker mit einer signifikant stärkeren IL-1 α -Sekretion auf die Stimulation mit dem finnischen Staubextrakt (mittlere Änderung: AA 7.18 zu GK 4.98, $p = 0.04$), als die Gruppe der gesunden Kontrollen. Der gleiche Sachverhalt zeigte sich nach der Stimulation mit LPS (mittlere Änderung: AA 5.99 zu GK 3.41, $p = 0.03$). Auch bei der Stimulation mit dem amischen Staubextrakt ließ sich dieser Trend beobachten (mittlere Änderung: AA 7.44 zu GK 4.82, $p = 0.056$). Allergische Asthmatiker reagierten mit einer signifikant stärkeren IL-5-Sekretion auf die Stimulation mit dem deutschen Staubextrakt (mittlere Änderung: AA 2.02 zu GK 0.54, $p = 0.01$) und mit dem amischen Staubextrakt (mittlere Änderung: AA 1.05 zu GK -0.23 (Werte immer log₂), $p = 0.03$) als die Gruppe der gesunden Kontrollen. Bei der Stimulation mit dem finnischen Staubextrakt zeigte sich ein Trend (mittlere Änderung: AA 1.56 zu GK 0.56, $p = 0.075$). In Abbildung 20 wird deutlich, dass die vor der Stimulation bestehenden Unterschiede in der Zytokinsekretion zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen nach der Stimulation durch die verschiedenen Staubextrakte nicht mehr beobachtet werden können.

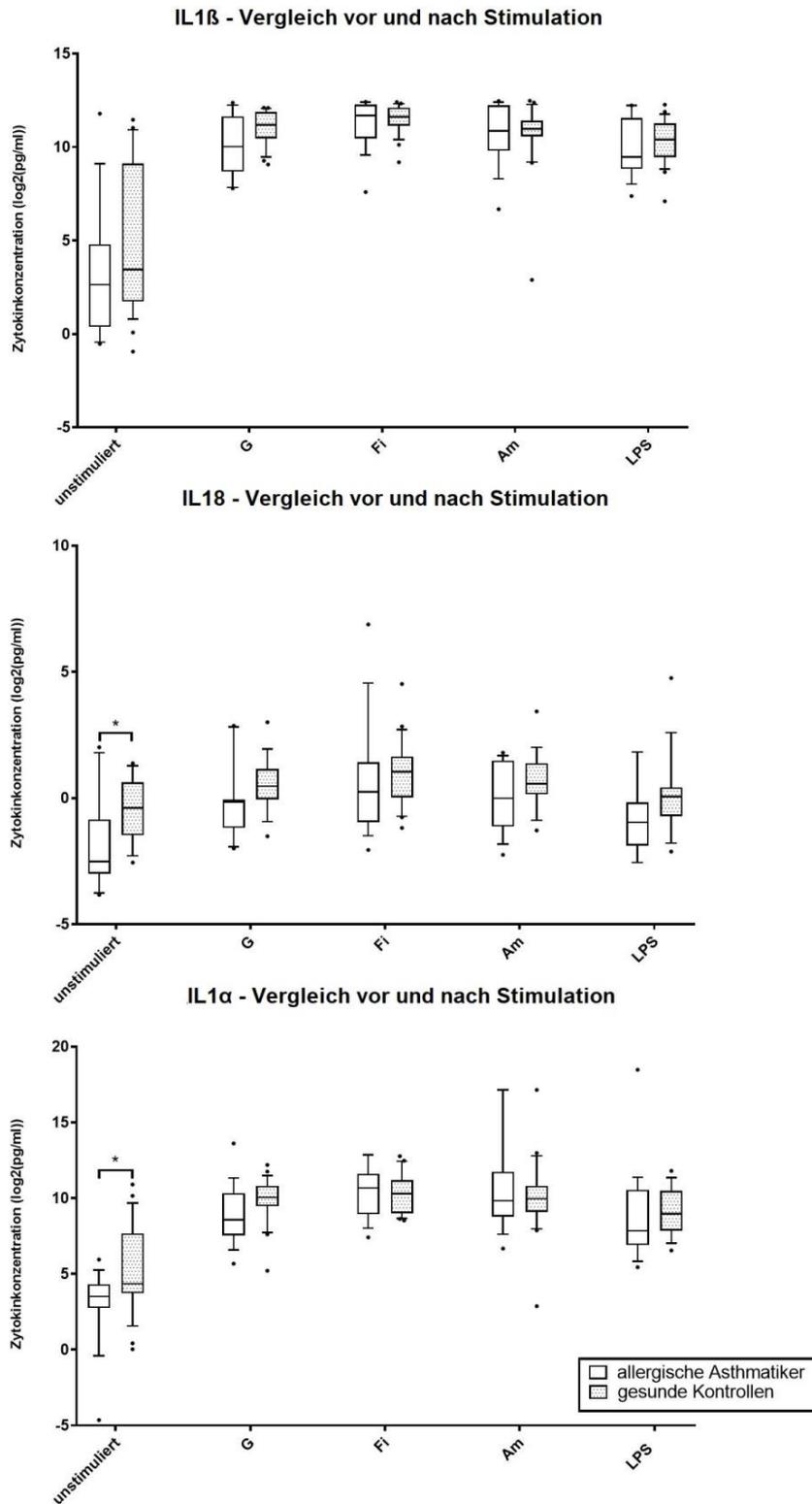


Abbildung 20: Zytokinsekretion der Interleukine 1 β , 18 und 1 α . Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen im Vergleich vor und nach Stimulation mit den Staubextrakten, gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Test ob signifikanter Unterschied zwischen Zytokinsekretion von *PBMCs* von allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Unter Stimulation mit den Staubextrakten änderte sich die IL 1 β - und IL-1 α -Sekretion signifikant stärker als die IL-18 Sekretion.

Die Zytokinsekretion der Interleukine 1 β und 1 α änderte sich unter Stimulation signifikant stärker als die IL-18- Sekretion (Abbildung 19). Dies konnte bei deutschem Staubextrakt (IL1 β _G vs. IL18_G, mittlere Änderung 6.56 vs 1.11, $p = <0.0001$; IL1 α _G vs. IL18_G, mittlere Änderung 5.10 vs. 1.11, $p = <0.0001$), finnischem Staubextrakt (IL1 β _Fi vs. IL18_Fi, mittlere Änderung 7.20 vs 2.20, $p = <0.0001$; IL1 α _Fi vs. IL18_Fi, mittlere Änderung 5.91 vs. 2.20, $p = 0.0002$) sowie amischem Staubextrakt (IL1 β _Am vs. IL18_Am, mittlere Änderung 6.47 vs 1.84, $p = <0.0001$; IL1 α _Am vs. IL18_Am, mittlere Änderung 5.93 vs. 1.84, $p = 0.0002$) beobachtet werden. Die IL-1 β - und IL-1 α -Sekretion unterschieden sich nicht signifikant. Bei der Stimulation mit LPS wurden signifikante Unterschiede zwischen IL-1 β (IL1 β _LPS vs. IL18_LPS, mittlere Änderung 5.99 vs 1.20, $p = <0.0001$), IL-1 α (IL1 α _LPS vs IL18_LPS, mittlere Änderung 4.63 vs. 1.20, $p = 0.0013$) und IL-18 beobachtet. Die IL-1 β - und IL-1 α -Sekretion änderte sich bei allen Stimulationsbedingungen stärker als IL-18-Sekretion.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt ergab sich eine Studienkohorte von n=46 Probanden. Allergische Asthmatiker zeigten signifikant höhere Werte an Gesamt-IgE und spezifischem IgE auf ganzjährige Allergene, saisonale Allergene sowie Tierallergene als gesunde Kinder. Außerdem zeigten sie höhere Prozentsätze an eosinophilen Granulozyten als gesunde Kinder. Weiterhin litten allergische Asthmatiker signifikant häufiger an einem Ekzem in ihrer Kindheit und hatten signifikant weniger ältere Geschwister als gesunde Kontrollen.

Die Genexpression des Immunoproteasoms unterschied sich nicht zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen. Die Genexpression der Marker des Immunoproteasoms wurde durch die Stimulation mit Staubextrakten signifikant supprimiert, die Genexpression des Markers des Proteasoms hingegen signifikant gesteigert (Tabelle 14). Das deutsche Staubextrakt bewirkte hierbei die stärksten Effekte. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen in der Änderung der Genexpression des Immunoproteasoms auf Staubstimulation.

	G			Fi			Ch			Am		
	alle	AA	GK	alle	AA	GK	alle	AA	GK	alle	AA	GK
LMP2	↓**	↓*	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
LMP7	↓*	↓***	↓	↓	↓*	↓	↓	↓*	↓	↓	↓***	↓
MECL1	↓	↓***	↓	↓***	↓**	↓*	↓***	↓**	↓**	↓	↓*	↓
PSMA3	↑	↑	↑	↑**	↑**	↑	↑	↑*	↑	↑**	↑**	↑

Tabelle 14: Übersicht über die Änderung der Genexpression des Immunoproteasoms nach Stimulation mit den Staubextrakten, gesammelt auf einem deutschen (G), einem finnischen (Fi), einem chinesischem (Ch) Bauernhof und bei den Amischen (Am). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen zeigten keinen Unterschied in der Genexpression des *NLRP3*-Inflammasoms. Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer Steigerung der *NLRP3*-Genexpression assoziiert. Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen zeigten sowohl in der Genexpression, als auch in der Zytokinsekretion der *NLRP3* abhängigen Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-1 α Unterschiede (Tabelle 16). *PBMCs* allergischer Asthmatiker zeigten weniger IL-1 β - und IL-1 α -Genexpression und Zytokinsekretion als gesunde Kontrollen. Interleukin 18 verhielt sich in Genexpression und Zytokinsekretion gegenläufig. In der *qPCR* exprimierten *PBMCs* von Asthma-

tikern mehr *IL-18*, in der Zytokinsekretion sezernierten sie hingegen weniger IL-18 als gesunde Kontrollen. Die Stimulation mit den Staubextrakten war sowohl mit einer Steigerung der *IL-1 β* - und *IL-1 α* -Genexpression, als auch der Zytokinsekretion assoziiert. Die *IL-18*-Genexpression zeigte sich nach der Stimulation mit den Staubextrakten signifikant supprimiert, wohingegen die IL-18-Zytokinsekretion sich nach Stimulation mit den Staubextrakten gesteigert zeigte.

	G			Fi			Ch			Am		
	alle	AA	GK	alle	AA	GK	alle	AA	GK	alle	AA	GK
NLRP3	↑**	↑**	↑*	↑*	↑**	↑	↓*	↓	↓	↑	↑	↑
CASP1	↑	↑	↑	↑***	↑***	↑*	↑	↑*	↑	↑**	↑**	↑
CASP4	↑	↑	↑	↑**	↑***	↑*	↑	↓	↑	↑**	↑**	↑
IL1β	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	****	****	****	****	****	****		****		****	****	****
Gen	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-	↑	↑	↑
	****	****	****	****	****	****				****	****	****
IL18	↓	↓	↓***	↓	↓	↓***	↑	↑	↑	↓	↓***	↓
	****	****	****	****	****	****				****	****	****
Gen	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-	↑	↑	↑
	**	*		***	*	***				****	**	**
IL1α	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	****	****	****	****	****	****	*	****		****	****	****
Gen	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-	↑	↑	↑
	****	****	****	****	****	****				****	****	****

Tabelle 15: Übersicht über die Änderung der Genexpression und Zytokinsekretion des Inflammasoms nach Stimulation mit den Staubextrakten, gesammelt auf einem deutschen (G), einem finnischen (Fi), einem chinesischem (Ch) Bauernhof und bei den Amischen (Am). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

	unstimuliert		G		Fi		Ch		Am	
	Gen	Zytokin	Gen	Zytokin	Gen	Zytokin	Gen	Zytokin	Gen	Zytokin
IL-1β	↓	↓	→	→	→	→	↓	→	→	→
IL-18	↑	↓	→	→	→	→	↑	→	→	→
IL-1α	↓	↓	→	→	→	→	↓	→	→	→

Tabelle 16: Unterschiede in der Genexpression und der Zytokinsekretion zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen ohne Stimulation und nach Stimulation mit Staubextrakten, gesammelt auf einem deutschen (G), einem finnischen (Fi), einem chinesischem (Ch) und bei den Amischen (Am). ↓, weniger Genexpression in der Gruppe der allergischen Asthmatiker, →, kein Unterschied in der Genexpression zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen, ↑, mehr Genexpression in der Gruppe der allergischen Asthmatiker.

Die Änderung der Genexpression sowie der Zytokinsekretion auf Stimulation mit den Staubextrakten zeigte sich in der Gruppe der allergischen Asthmatiker signifikant stärker als bei den gesunden Kontrollen. Nach Stimulation mit den Staubextrakten bestand kein Unterschied mehr in der Genexpression und Zytokinsekretion von IL-1 β , IL-18 und IL-1 α zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen (Tabelle 16).

6 Diskussion

6.1 Charakteristika der Studienkohorte

Die Gruppen der allergischen Asthmatiker und gesunden Kontrollen unterscheiden sich signifikant in Geschlecht, im prozentualen Anteil der eosinophilen Granulozyten und im Gesamt- sowie spezifischen IgE.

Da die Gruppe der allergischen Asthmatiker mit 28.6% (w) zu 68% (m) signifikant weniger weibliche Probanden umfasst, wurde für das Geschlecht adjustiert. Hier zeigt sich kein Geschlechtereffekt auf die Genexpression und die Zytokinsekretion. Weiterhin unterscheiden sich die Gruppen signifikant im prozentualen Anteil der eosinophilen Granulozyten (8.0% bei AA zu 3.0% bei GK) und im Gesamt- sowie spezifischen IgE (AA 358.71IU/ml zu GK 93.95IU/ml). Der erhöhte Prozentsatz eosinophiler Granulozyten sowie das erhöhte Gesamt- sowie spezifische IgE wurden bereits in vielen Studien bei allergischen Asthmatikern und vor allem in akuten Asthmaexazerbationen beschrieben und beides wird im klinischen Alltag zu diagnostischen Zwecken herangezogen, ebenso setzen etablierte Therapeutika hier an. Omalizumab zum Beispiel, ein rekombinanter, monoklonaler Antikörper gegen humanes IgE ist in den USA bereits als Therapieoption bei schwerem allergischem Asthma bronchiale zugelassen [1, 74-78]. Die signifikanten Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen im prozentualen Anteil der eosinophilen Granulozyten und im Gesamt- sowie im spezifischem IgE bestätigen somit die Studiengruppenauswahl und die Zuordnung der jeweiligen Probanden zu den Studiengruppen.

Kinder mit allergischem Asthma leiden neben Asthma bronchiale häufig an einem atopischen Ekzem und einer atopischen Rhinokonjunktivitis.

Über die Hälfte (52.4%) der allergischen Asthmatiker bekamen bis zum Einschluss in die Studie die ärztliche Diagnose eines atopischen Ekzems gestellt, bei den gesunden Kontrollen wurde dies bei keinem Kind angegeben ($p = < 0.001$). 57.1% der allergischen Asthmatiker bekamen die ärztliche Diagnose "allergische Rhinokonjunktivitis" gestellt, auch hier zeigte sich kein Fall in der Gruppe der gesunden Kinder ($p = < 0.001$). In der Literatur wird oft die Komorbidität von Asthma bronchiale und dem atopischen Ekzem bzw. der atopischen Dermatitis sowie der atopischen Rhinokonjunktivitis beschrieben. Es wird vom atopischen Marsch, von Ekzem über allergische Rhinitis bis zu Asthma bronchiale gesprochen [79-83]. Weiterhin führt eine Komorbidität zwischen Ekzem und

allergischem Asthma zu schwereren Asthmaexazerbationen und erschwert die Therapie [84, 85]. Der Mechanismus des atopischen Marschs sowie der häufigen Komorbidität zwischen Asthma, Ekzem und atopischer Rhinokonjunktivitis ist bis heute nicht abschließend geklärt. Es bestehen Überlegungen, dass eine primäre Sensibilisierung über die Haut zu einer späteren Sensibilisierung der Atemwege führen könnte. Ob dies der Fall ist oder ob dem atopischen Ekzem, der atopischen Rhinokonjunktivitis und dem Asthma bronchiale eine ähnliche Pathophysiologie zugrunde liegen, bleibt unklar. Es konnten jedoch Signalwege gefunden werden, die sowohl an der Entstehung des Asthma bronchiale als auch an der Entstehung der weiteren Erkrankungen des atopischen Formenkreises beteiligt zu sein scheinen, so Interleukin 1 β [83, 86]. Da sich auch bei allen Erkrankungen des atopischen Formenkreises eine Zunahme der Inzidenz sowie der protektive Einfluss der Bauernhofumgebung beobachten lässt, könnten Schlussfolgerungen aus der Asthmaforschung übertragen werden [25].

Mütter allergischer Asthmatiker gaben häufiger an selbst an Heuschnupfen zu leiden (Trend $p = 0.086$) und zeigten einen höheren Bildungsstand (Trend $p = 0.063$) als Mütter gesunder Kinder.

Mütter allergischer Asthmatiker (45%) gaben häufiger an selbst an Heuschnupfen zu leiden, als Mütter gesunder Kinder (8.3%, $p = 0.086$). Bei der Frage nach Asthma bronchiale gaben 19% der Mütter allergischer Asthmatiker an, selbst an Asthma zu leiden. In der Gruppe der gesunden Kinder hingegen waren es nur 8.3%. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Beobachtungen passen jedoch zu den, in der Literatur beschriebenen Gegebenheiten. Asthma bronchiale zeigt eine genetische Komponente, Kinder atopisch erkrankter Mütter erkranken öfter in ihrem Leben selbst an einer Erkrankung des atopischen Formenkreises als Kinder gesunder Mütter [87-90]. Gründe für die hier fehlenden Signifikanzen könnte die Methode der Informationsgewinnung über einen Fragebogen sein. Eine fehlerhafte Einschätzung und Erinnerung der Mütter bezüglich der eigenen Diagnose Asthma bronchiale kann die Ergebnisse beeinflusst haben. Da die gewonnen Ergebnisse jedoch Zusammenhänge erkennen lassen, zeigt sich die Größe der Studienkohorte als weitere plausible Limitation. Eine Erweiterung der Studienkohorte könnte signifikante Beobachtungen ermöglichen.

Weiterhin zeigte sich in der analysierten Studienkohorte, dass Mütter allergischer Asthmatiker einen höheren Bildungsabschluss absolvierten, als Mütter gesunder Kinder. Auch in der Literatur finden sich Studien, die einen hohen sozioökonomischen Status als Risikofaktor für atopische Erkrankungen sehen [91, 92]. Andere Studien assoziieren

jedoch eine hohe Asthmaprävalenz mit einem niedrigen sozioökonomischen Status [93-96]. Inwiefern der sozioökonomische Status mit der Prävalenz eines Asthma bronchiale zusammenhängt ist somit umstritten. Die Aussagekraft der hier gezeigten Ergebnisse bezüglich des sozioökonomischen Status ist limitiert. Es wurde zwischen "keinem Schulabschluss, Haupt-oder Realschulabschluss" und "Gymnasial-oder Hochschulabschluss" unterschieden. Womöglich hätte eine genauere Einteilung und die Erhebung weiterer sozioökonomischer Daten, wie das Einkommen deutlichere Ergebnisse gezeigt.

Gesunde Kinder haben mit 62.5% signifikant häufiger ($p = 0.016$) ältere Geschwisterkinder als allergische Asthmatiker (21.1%). In der Frage "Geschwisterkinder überhaupt" unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht.

Viele Studien beschreiben einen protektiven Effekt älterer Geschwisterkinder für Asthma bronchiale [90, 91, 97, 98]. In einigen Studien zeigt sich auch "Geschwisterkinder überhaupt" als protektiver Faktor, die Altersverteilung bleibt hierbei irrelevant. In anderen Studien konnte wiederum kein protektiver Effekt für Geschwisterkinder detektiert werden [99-102]. *Kikkawa et al.* beschreiben einen altersabhängigen Effekt bezüglich des Einflusses älterer Geschwister auf das Risiko an Asthma bronchiale zu erkranken. Kinder mit älteren Geschwistern zeigten während ihrer frühen Kindheit ein erhöhtes Risiko an Asthma zu erkranken. Im Schulalter stellen ältere Geschwister einen protektiven Faktor gegen Asthma bronchiale dar [101]. Eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt älterer Geschwister bietet die Hygienehypothese. Der frühere Kontakt mit der mikrobiellen Außenwelt sowie frühere Infektionen, die durch ältere Geschwisterkinder vermehrt übertragen werden, erklären den protektiven Einfluss. Diese Kausalität bleibt jedoch umstritten. So zeigten sich in einer Studie von *Genuneit et al.* zusätzliche protektive Effekte für das Leben auf dem Bauernhof und ältere Geschwisterkinder. Dies spricht gegen die alleinige Erklärung des protektiven Effekts älterer Geschwister mittels Hygienehypothese [103]. Verschiedene andere Erklärungsmodelle wurden postuliert. So zum Beispiel, dass eine veränderte Immunsituation der Mutter bei sekundärer und weiteren Schwangerschaften gegebenenfalls eine unterschiedliche pränatale Prägung des Immunsystems des Kindes bedingt. So konnte bei Erstgeborenen ein schwächeres antiinflammatorisches T-Zell Profil im Vergleich zu Kindern mit älteren Geschwisterkindern gezeigt werden [104, 105].

Abschließend kann man sagen, dass die Charakteristika der Studienkohorte und die Unterschiede zwischen den Gruppen der allergischen Asthmatiker und gesunder Kinder, den in der Literatur diskutierten Themen entsprechen und die Zuteilung zu den jeweili-

gen Gruppen stützen. Und obwohl der Schwerpunkt dieser Studie nicht auf sozioökonomischen Aspekten lag, zeigten sich trotz der verhältnismäßig kleinen Studienkohorte interessante Aspekte.

6.2 Rolle des Immunoproteasom beim Asthma bronchiale

Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der Untereinheiten des Immunoproteasoms.

Das Immunoproteasom scheint bei vielen Autoimmunerkrankungen, wie der Kolitis ulzerosa oder der rheumatoiden Arthritis eine wichtige Rolle zu spielen [50, 51]. Die Rolle des Immunoproteasoms beim Asthma bronchiale ist bisher unklar. Wie bereits beschrieben, führt die Inhibition des Immunoproteasoms zu einer Veränderung der T-Zelldifferenzierung, die mit einer verstärkten Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen einhergeht [51]. Der protektive Effekt der regulatorischen T-Zellen über die Balance des Immunsystems wurde im Zusammenhang mit Asthma bronchiale und dem "Bauernhofeffekt" wiederholt beschrieben [7, 11-14, 38, 39]. Dies, sowie die Besserung der Asthmasymptomatik unter unspezifischer Proteasominhibition und spezifischer Immunoproteasominhibition [52, 54] führte zu der Annahme, dass das Immunoproteasom bei Asthma bronchiale eine entscheidende Rolle spielt. Entgegen der Erwartungen zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Genexpression der katalytischen Untereinheiten *LMP2*, *LMP7* und *MECL1* des Immunoproteasoms sowie der Untereinheit *PSMA3* des Proteasoms zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen. In Bezug auf die Aussagekraft der Ergebnisse für die Bedeutung des Immunoproteasoms bei Asthma bronchiale müssen einige Faktoren beachtet werden. Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollprobanden unterscheiden sich bezüglich des Immunoproteasoms nicht in ihrer Genexpression, aber auch ohne eine Veränderung der Genexpression, können quantitative Unterschiede in der Proteinmenge bestehen. Weiterhin können neben quantitativen, auch qualitative Unterschiede in der Regulierung des Immunoproteasoms und Proteasoms zwischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen vorliegen. Weiterhin wurde die Genexpression des Immunoproteasoms und Proteasoms in *PBMCs* analysiert. Dies lässt eingeschränkte Aussagen über lokale Vorgänge in der Lunge zu. *Volkov et al.* beobachteten im Mausmodell bei *LMP7*-Defizienz Effekte in der bronchoalveolären Lavage (BAL) [54]. Auch konnten im erwachsenem, humanem Lungengewebe bei pulmonalen Erkrankungen, wie der COPD und Sarkoidose, Immunoproteasom- und Proteasomspezifische Veränderungen nachgewiesen werden [106, 107]. Studien zeigten, dass sich die Genexpression sowie die Aktivität des Immunoproteasoms

und Proteasoms in verschiedenen Geweben unterscheiden [108, 109]. Möglicherweise ist in pulmonalen Gewebeproben eine Rolle des Immunoproteasoms und Proteasoms in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale erkennbar. Da in dieser Arbeit jedoch das Asthma im Kindesalter betrachtet wird, ist die Untersuchung von Gewebeproben deutlich erschwert. Die Durchführung einer BAL für Forschungszwecke wäre ethisch nicht zu rechtfertigen und ist aus medizinischen Gründen in den seltensten Fällen indiziert.

Weiterhin besteht die untersuchte Studienpopulation aus steroid-naiven allergischen Asthmatikern. Dies geht bei vielen der Kinder mit einer zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses milderen Krankheitsphase einher. Weitere Studien unter akuter Asthmaexazerbation oder mit einer Unterteilung in Subgruppen mit unterschiedlichem Schweregrad der Erkrankung könnten Hinweise für eine Rolle des Immunoproteasoms je nach Schweregrad der Symptomatik aufzeigen. So zeigt sich bei Inhibition des Immunoproteasoms in Autoimmunerkrankungen ein dosisabhängiger Effekt auf die Klinik, so bei rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Je stärker die Inhibition des Immunoproteasoms, desto deutlicher zeigen sich positive Effekte bezüglich der Klinik [50, 110]. Es ist denkbar, dass das Immunoproteasom bei Asthma bronchiale erst bei schwereren Krankheitssymptomen hoch reguliert wird.

Weiterhin können die gewonnenen Ergebnisse auch für eine fehlende Rolle des Immunoproteasoms und Proteasoms bei Asthma sprechen. Da die Ergebnisse unter Stimulation mit den auf Bauernhöfen gewonnenen Staubextrakten jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Immunoproteasom und dem "Bauernhofeffekt" vermuten lassen, ist eine Bedeutung des Immunoproteasoms in der Asthmaprotektion und somit allgemein in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale weiterhin denkbar.

Die Stimulation mit den auf Bauernhöfen gewonnenen Staubextrakten war mit einer reduzierten Genexpression der katalytischen Untereinheiten des Immunoproteasoms und einer erhöhten Genexpression der PSMA3 Untereinheit des Proteasoms assoziiert.

Nach Stimulation mit den Staubextrakten *in vitro* zeigte sich die Genexpression der Untereinheiten des Immunoproteasoms und Proteasoms signifikant verändert. Die Stimulation der *PBMCs* allergischer Asthmatischer und gesunder Kontrollen mit den vier von Bauernhöfen stammenden Staubextrakten war mit einer signifikanten Reduktion der Genexpression der katalytischen Untereinheiten des Immunoproteasoms *LMP7* und *MECL1* assoziiert. Sowohl bei der Betrachtung der gesamten Studienkohorte, als auch

bei isolierter Betrachtung der allergischen Asthmatiker und gesunden Kontrollen konnten diese Veränderungen beobachtet werden. Die Genexpression der katalytischen Untereinheit *LMP2* war nur nach Stimulation mit dem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenem Staubextrakt signifikant reduziert. Weiterhin war die Stimulation mit LPS mit einer signifikanten Reduktion der Genexpression aller katalytischen Immunoproteasom-Untereinheiten assoziiert. Betrachtet man das Proteasom, so war die Stimulation mit den Staubextrakten mit einer signifikanten Steigerung der Genexpression der *PSMA3* Untereinheit assoziiert. In Studien konnte bereits eine Assoziation zwischen Stimulation mit LPS und einer Veränderung der Expression und Aktivität des Immunoproteasoms gezeigt werden: Durch einmalige LPS Stimulation zeigte sich bei *Reis et al.* ein Anstieg der Genexpression der Untereinheiten *LMP2*, *LMP7* sowie *MECL1* [111]. *Silswal et al.* beobachteten das Immunoproteasom in drei verschiedenen Zellkulturen (murine Makrophagen, THP1 und CD14⁺) unter einmaliger und zweimaliger LPS Stimulation. Die einmalige Stimulation war mit einer Erhöhung der Genexpression aller katalytischen Untereinheiten des Immunoproteasoms (*LMP2*, *LMP7*, *MECL1*) assoziiert. Bei zweimaliger Stimulation mit LPS zeigte sich im Vergleich zur einmaligen Stimulation, eine signifikante Reduktion der Genexpression der katalytischen Untereinheiten des Immunoproteasoms sowie der enzymatischen Aktivität des Immunoproteasoms [112]. Diese Beobachtung wurde als Toleranzentwicklung gegenüber LPS bei mehrmaliger Stimulation interpretiert. Die verminderte Genexpression der katalytischen Untereinheiten des Immunoproteasoms nach Stimulation mit den Staubextrakten spricht für einen protektiven Effekt der Staubextrakte, es kann als regulierender Stimulus gegen die Immunreaktion mittels Immunoproteasom verstanden werden. Anders als bei *Silswal et al.* war schon die einmalige Stimulation mit einer signifikanten Reduktion der Genexpression assoziiert. Dies spricht für einen Effekt der Staubextrakte über den der Toleranzentwicklung durch LPS hinaus. Bei *Silswal et al.* sowie *Reis et al.* zeigten sich bei Stimulation mit LPS nach 4h beziehungsweise nach 12 Stunden stärkere Effekte als nach 24 Stunden Stimulationsdauer [111, 112]. Die Zeitspanne der Stimulation scheint somit von Bedeutung zu sein. Durch eine kürzere Stimulationsdauer könnten Unterschiede in der Reaktion auf die Staubextrakte zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen sichtbar werden. Grundsätzlich geben diese Ergebnisse jedoch wichtige Hinweise auf eine Rolle des Immunoproteasoms beim "Bauernhofeffekt". Die Bauernhofumgebung geht mit einer quantitativen Reduktion der Genexpression des Immunoproteasoms einher. Dies kann eine Stellschraube im Mechanismus zur Steige-

rung der Treg-Differenzierung sein, die bereits in Zusammenhang mit dem "Bauernhofeffekt" gebracht wurde.

6.3 Rolle des Inflammasoms beim Asthma bronchiale

6.3.1 Rolle des NLRP3-Inflammasoms und der Caspasen 1 und 4

Allergische Asthmatiker zeigten keinen signifikanten Unterschied in der NLRP3, CASP1 und CASP4 Genexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Wie bereits beschrieben, zeigte sich basal kein Unterschied in der Genexpression des NLRP3-Inflammasoms zwischen *PBMCs* allergischer Asthmatiker und gesunder Kinder. In diversen Studien zeigten sich Hinweise, die ein anderes Ergebnis erwarten ließen. So geht ein Singulärer Nukleotid Polymorphismus (SNP) im *NLRP3*-Gen mit einem erhöhten Risiko für anaphylaktische Reaktionen auf Nahrungsmittel sowie mit einem erhöhten Risiko für Aspirin-induziertes Asthma einher [63]. Auch durch Ergebnisse in murinen Versuchen wurde die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms als bedeutende Komponente in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale vermutet: Eine pharmakologische Inhibition des NLRP3-Inflammasoms führte zu reduzierter Entzündung im murinen Hausstaubmilben-induzierten (HDM) Asthma-Modell [113]. Bei diesem Modell wird durch Sensibilisierung und wiederholte Exposition gegenüber Hausstaubmilben ein, dem humanen allergischen Asthma bronchiale, sehr ähnlicher muriner *in vivo* Versuchsaufbau geschaffen [55]. Auch *Besnard et al.* beobachteten bei NLRP3-Defizienz weniger eosinophile Granulozyten, IgE und proinflammatorische Zytokine im murinen *in vivo* OVA-Asthma Modell [64]. Ähnliche Ergebnisse präsentierten *Ritter et al.*. NLRP3-Defizienz führte zu verringerter Antikörperproduktion, weniger TH2-Zell-Differenzierung und weniger eosinophilen Granulozyten [66, 114]. Weiterhin zeigten sich in bronchialen Epithelzellen von Asthmatikern eine verstärkte NLRP3 und CASP1 Detektion [59]. All diese Ergebnisse führten zu der Hypothese einer verstärkten Expression des NLRP3-Inflammasoms in *PBMCs* allergischer Asthmatiker. Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei Asthma bronchiale ist jedoch auch in der Literatur umstritten. Auch *Brickey et al.* konnten keinen Unterschied in der *NLRP3*-Genexpression im Sputum erwachsener Asthmatiker und gesunder Kontrollen beobachten [115]. *Allen et al.* detektierten keinen Unterschied im murinen OVA- oder HDM-Asthma-Modell zwischen NLRP3- *Knock-out* (KO)- und *Wildtyp* (WT)- Mäusen bezüglich eosinophilen Granulozyten, Histopathologie, Mukusproduktion oder Atemwegshyperreaktivität

[116]. Und *Tran et al.* beobachteten sogar eine erniedrigte *NLRP3*-Genexpressionen im murinen OVA-Asthma Modell [117]. Eine Erklärung der unterschiedlichen Erkenntnisse über die Bedeutung des *NLRP3*-Inflammasoms bei Asthma bronchiale kann die Möglichkeit eines von Transkription, Translation und dem bekannten Inflammasom-Signalweg unabhängigen Regulationsmechanismus sein. *Wang et al.* fanden unter Sevofluran eine Besserung der Klinik eines Asthma bronchiale sowie eine Reduktion der *NLRP3*-Genexpression, jedoch nicht der *Caspase 1*-Genexpression oder der Interleukine. Diese entkoppelte Regulierung könnte für eine Rolle von *NLRP3*, unabhängig des bekannten Signalweges über *CASP1* und die Interleukine sprechen [118]. Es gibt Hinweise, dass *NLRP3* als Transkriptionsfaktor wirkt und die Lokalisation des Transkriptionsfaktors der entscheidende regulatorische Mechanismus ist [119]. Eine weitere mögliche Erklärung für fehlende Unterschiede trotz des begründeten Verdachts für eine Rolle des *NLRP3*-Inflammasoms im Asthma bronchiale, stellt auch hier die Heterogenität der Erkrankung dar. So stellten *Simpson et al.* eine erhöhte *IL1 β* - und *NLRP3*- Genexpression im neutrophilen, jedoch nicht im eosinophilen Asthma fest [120]. Andere Studien zeigten die Rolle des *NLRP3*- Inflammasoms vor allem bei schwerem, therapieresistentem Asthma [121, 122]. Es muss daher berücksichtigt werden, dass es sich in der hier untersuchten Studienpopulation um zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses steroidnaive allergische Asthmatiker handelt und dies mit einer milderen Krankheitsphase der Erkrankung einhergeht.

Die Stimulation durch die Staubextrakte war mit einer signifikanten Steigerung der NLRP3-Genexpression assoziiert.

Das *NLRP3*-Inflammasom detektiert unzählige Pathogen-assoziierte molekulare Partikel (PAMPs) und Gefahr-assoziierte molekulare Partikel (*danger-associated molecular patterns, DAMPs*), unter anderem bakterielle RNA und multiple Endotoxine verschiedener Bakterien, wie *Greaney et al.* in ihrem Review zusammenfassen [57-59, 70, 123, 124]. Weiterhin nimmt *NLRP3* eine Rolle in der Feinstaubdetektion ein [72]. Nanopartikel werden durch das *NLRP3*-Inflammasom detektiert und das Inflammasom scheint an der Entstehung von nanopartikelbedingten Exazerbationen beteiligt zu sein [125, 126]. Dies alles macht den großen Einfluss der Umgebung auf das *NLRP3*-Inflammasom deutlich. Auch in den Staubextrakten finden sich hohe Mengen an bakterieller 16sRNA, vor allem gram-negativer Proteobakterien sowie eine große Menge LPS, wie unsere Forschungsgruppe unter *Krusche et al.* publizieren konnten [127]. Diese Substanzen führen zur Aktivierung des *NLRP3*-Inflammasoms und erklären somit

die, mit der Stimulation durch die Staubextrakte assoziierten Steigerungen der *NLRP3*-Genexpression. Anders als erwartet, zeigte sich kein Unterschied in der *NLRP3*-Genexpression zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen unter Stimulation mit den Staubextrakten. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Stimulation mit den Staubextrakten mit einer Veränderung der *NLRP3*-Genexpression assoziiert ist und im Zusammenhang mit den weiteren Ergebnissen bezüglich der Interleukine lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Signalweg des NLRP3-Inflammasoms und dem "Bauernhofeffekt" vermuten.

6.3.2 Relevanz der Interleukine beim Asthma bronchiale

PBMCs allergischer Asthmatischer zeigten eine geringere Sekretion von Interleukin 1 β und Interleukin 1 α als PBMCs gesunder Kontrollen. Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer signifikanten Steigerung der IL-1 β - und IL-1 α -Genexpression assoziiert. Die PBMCs allergischer Asthmatischer reagierten signifikant stärker als PBMCs gesunder Kontrollen auf die Stimulation. Die Stimulation durch die Staubextrakte war mit einem Ansteigen der Zytokinkonzentrationen assoziiert.

Allergische Asthmatischer zeigten eine signifikant geringere *IL-1 β* -Genexpression als gesunde Kontrollen. Auf Proteinebene verhielt es sich ebenso, allerdings zeigte sich hier keine Signifikanz. In der Literatur finden sich kontroverse Ergebnisse über die Bedeutung von Interleukin 1 β in Allergie und allergischem Asthma. Eine potenzielle Rolle von IL-1 β konnte in vielen Studien beobachtet werden. *Brickey et al.* beschrieben im Sputum von Patienten mit Asthma eine verminderte Konzentrationen von IL-1 β und IL-1 α sowie eine verminderte Genexpression [115]. *Tran et al.* detektierten eine verminderte *IL-1 β* - und *IL-18*-Genexpression in Lungenepithelzellen im murinen OVA Modell [117]. Andere Studien fanden gegensätzliche Ergebnisse. So beschrieben *Sobkowiak et al.* drei Singuläre Nukleotid Polymorphismen (SNP) im IL-1 β Gen, die mit einem erhöhten Risiko für kindliches Asthma assoziiert sind, sowie erhöhte IL-1 β Level im Serum von an Asthma erkrankten Kindern. Weitere Studien zeigten erhöhte IL-1 β -Spiegel in Serum, Sputum, Lungenepithel und BAL von an Asthma bronchiale erkrankten Patienten [67, 128-131]. Weiterhin zeigten sich bei IL-1 β -defizienten Mäusen eine reduzierte Hyperreaktivität der Atemwege, eine geringere T-Zell-Proliferation und Interleukinsekretion sowie geringere Level an IgE im Vergleich zu Wildtypmäusen [132]. Bei einer Interleukin-1-Rezeptor-Defizienz zeigte sich im murinen OVA-Modell in der BAL eine reduzierte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten im Vergleich zu Wildmäusen [133]. Weiterhin ist die Behandlung des Asthma bronchiale mit Glukokortikoiden mit

der Reduktion von IL-1 β assoziiert [134]. Eine mögliche Erklärung für die kontroversen Ergebnisse zur Rolle von IL-1 β in Asthma bronchiale ist die Diversität der Erkrankung. So zeigen symptomatische Patienten oder Patienten im Status asthmaticus erhöhte IL-1 β Spiegel in der BAL und im Sputum im Vergleich zu Patienten mit schwächerer Symptomatik. Ebenso geht schweres, steroid-resistentes Asthma bronchiale mit erhöhten IL-1 β Werten einher [121, 128, 129, 135-137].

Neben IL-1 β zeigte sich auch IL-1 α in der Genexpression von *PBMCs* asthmatischer Kinder im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt. Dies zeigte sich auch auf Proteinebene. IL-1 α gehört wie IL-1 β zur Interleukin-1-Familie. Wie auch bei IL-1 β scheint die Sekretion NLRP3-Inflammasom abhängig zu sein [126, 138, 139]. So beschreiben *Gross et al.*, dass alle Inflammasom Aktivatoren zur Co-Sekretion von IL-1 α und IL-1 β führen, es aber neben dem Inflammasom-abhängigen Signalweg, eine weitere Möglichkeit der IL-1 α Regulierung gibt [139]. *Fettelschloss et al.* postulierten eine IL-1 β abhängige Sekretion von IL-1 α . Sie sind der Meinung, Studien über die Bedeutung von IL-1 β in verschiedensten Krankheiten müssten unter diesem Aspekt neu evaluiert werden. In vielen der bisher IL-1 β zugesprochenen beobachteten Effekte könnte auch IL-1 α eine entscheidende Rolle spielen [138]. IL-1 β und IL-1 α scheinen voneinander abhängig reguliert zu sein, so sezernieren IL-1 α defiziente Makrophagen weniger IL-1 β [140]. Dies zeigte sich auch im Mausmodell, IL-1 β bindet IL-1 α direkt und scheint so für die Sekretion von zentraler Bedeutung [138]. Über die Rolle von IL-1 α in Asthma bronchiale ist bisher weniger bekannt als über die Rolle von IL-1 β . Es gibt nur wenige widersprüchliche Studien. *Besnard et al.* beschrieben im IL-1 α -defizienten murinen OVA-Modell, ebenso wie bei IL-1 β -Defizienz, eine verringerte Entzündung [64]. Auch führte die Neutralisierung von IL-1 α während des T-Zell-*Primings* im HDM Asthma Modell zu signifikant weniger Atemwegsentzündung [141]. Auch *Willart et al.* neutralisierten IL-1 α während der Sensibilisierung im HDM Asthma Modell und erzielten somit reduzierte Anteile an eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in den Atemwegen sowie reduzierte Immunglobulin-Level und weniger TH2-Antwort typische Zytokine. Die Neutralisierung von IL-1 β hatte hingegen keinen signifikanten Effekt [142]. Diese Studien geben Hinweise auf eine Rolle von IL-1 β und IL-1 α vor allem in der Entstehung von Asthma bronchiale.

Weiterhin zeigten *PBMCs* allergischer Asthmatiker in Remission unter Stimulation mit *Dermatophagoides farinae* und LPS deutlich niedrigere IL-1 α Level als *PBMCs* akut erkrankter Patienten [143]. Dies deutet darauf hin, dass die Interleukine 1 β und 1 α -Le-

vel mit dem aktuellen Schweregrad der Erkrankung Asthma bronchiale assoziiert sind. Wie bereits erwähnt besteht die untersuchte Studienpopulation aus steroidnaiven allergischen Asthmatikern, keins der Kinder wurde zum Zeitpunkt der Rekrutierung mit Glukokortikoiden therapiert. Dies geht bei vielen der Kinder mit einer zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses milderen Krankheitsphase einher. Es bestanden jedoch weiterhin die Diagnosekriterien für Asthma bronchiale und eine medikamentöse Therapie mittels β -Sympathomimetika. Einige der Kinder wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose rekrutiert und zeigten eine stark ausgeprägte Klinik, bei denen nach Studieneinschluss und Probenentnahme eine Glukokortikoidtherapie indiziert war. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass sich der Großteil der Studienpopulation zu Studieneinschluss in einer milderen Krankheitsphase befand. Dies könnte auch die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe erklären. In der Gesamtkohorte CLARA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Interleukin 1 β zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen [15]. IL-1 β und IL-1 α könnten somit vor allem bei schwerem Asthma bronchiale und in der akuten Exazerbation erhöht sein und im kontrollierten Asthma erniedrigt sein. Man kann die erniedrigten IL-1 β und IL-1 α Level bei allergischen Asthmatikern in unserer Studie als ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Entzündung und Regulation verstehen. Bei gesunden Kindern kann das Immunsystem *per se* im Gleichgewicht stehen und so können erhöhte Konzentrationen an IL-1 β und IL-1 α ohne weitere Zeichen einer Entzündung toleriert werden. Eine weitere Erklärung der erhöhten Interleukin 1 β und 1 α Level bei gesunden Kontrollen im Vergleich zu allergischen Asthmatikern kann der Versuchsaufbau darstellen. Die *PBMCs* wurden für 24h inkubiert, dies stellt für die Zellen eine Stresssituation und nicht die wirklichen Vorgänge *in vivo* dar. Womöglich reagieren *PBMCs* gesunder Kontrollen auf eine solche Stresssituation sensibler und mit einer stärkeren inflammatorischen Antwort als *PBMCs* allergischer Asthmatischer, da das Immunsystem allergischer Asthmatischer durch die Grunderkrankung an stärkere Stresssituationen besser adaptiert ist. Die Betrachtung der Interleukine direkt nach der Probenentnahme wäre zur weiteren Betrachtung dieser Hypothese von großem Interesse.

Die Stimulation mit den Staubextrakte war mit einer Veränderung der IL-1 β und IL-1 α Konzentration assoziiert. Die Genexpression der Interleukine 1 β und 1 α zeigten sich nach Stimulation signifikant gesteigert, ebenso die Zytokinsekretion. Die Stimulation war in der Gruppe der allergischen Asthmatischer mit größeren Veränderungen assoziiert als in der Gruppe der gesunden Kontrollen. Nach Stimulation zeigte sich kein signifi-

kanter Unterschied der Interleukin 1 β - und Interleukin 1 α -Konzentration zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen mehr. Dies könnte auf eine geringere Immuntoleranz des Immunsystems allergischer Asthmatiker unabhängig vom Stimulus hindeuten. Eine mögliche Hypothese ist, dass durch die Stimulation mit den Staubextrakten zunächst eine Immunaktivierung unabhängig vom Stimulus erfolgt und *PBMCs* allergischer Asthmatiker auf jede Art von Stimulus zunächst empfindlicher mit einer stärkeren IL-1 β und IL-1 α - Sekretion reagieren als *PBMCs* gesunder Kontrollen. Von Interesse ist nun die Frage, ob sich diese Beobachtung zu weiteren Zeitpunkten der Stimulation oder nach mehrmaliger Stimulation bestätigen lässt. Unsere Ergebnisse geben erste Hinweise, dass die Stimulation mit den Staubextrakten zu einer Modellierung des Inflammation-Signalweges führen und, dass IL-1 β und IL-1 α in den Mechanismus des "Bauernhofeffekts" involviert sein könnten. Es lässt sich jedoch vermuten, dass der Zeitpunkt und die Frequenz der Stimulation von Bedeutung sind und weitere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang von großem Interesse sind.

Allergische Asthmatiker zeigten eine erhöhte Interleukin-18-Genexpression im Vergleich zu gesunden Kindern. Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer Reduktion der IL-18 Genexpression assoziiert. Nach der Stimulation zeigten sich keine Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen mehr. PBMCs allergischer Asthmatiker sezernieren signifikant weniger Interleukin 18 als PBMCs gesunder Kontrollen.

In der Gruppe der allergischen Asthmatiker zeigten sich im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollen erhöhte IL-18 Genexpressionslevel. Widersprüchlich dazu zeigte sich eine signifikant geringere IL-18 Zytokinsekretion. Wie auch bei IL-1 β und IL-1 α finden sich in der Literatur uneinheitliche Aussagen bezüglich der Relevanz von IL-18 beim Asthma bronchiale. Viele Studien sehen eine potentielle Rolle von IL-18 in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale: So führt IL-18-Stimulation im Mausmodell zur TH2-Antwort sowie zu allergischer Symptomatik [144]. Weiterhin berichten *Imaoka et al.* über erhöhte Serum-IL-18-Spiegel bei allergischen Asthmatikern [145]. Weitere Studien detektierten ebenfalls erhöhte IL-18 Level im Serum von an Asthma bronchiale erkrankten Patienten [69, 146, 147] sowie erhöhte Level an löslichem IL-18-Rezeptor [148]. Bei IL-18-KO-Mäusen ließen sich im Asthmodell im Vergleich zum WT geringere Entzündungsreaktionen und weniger chronische Umwandlungsprozesse beobachten [149]. *McKay et al.* wiederum fanden basal keinen Unterschied im IL-18-Level zwischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen, ebenso wie *Rovina et al.* [150]. *Hartwig et al.* detektierten, anders als *Yamagata et al.* [149] keinen Effekt im murinen

IL-18-KO-OVA-Model [151]. Andere Studien beschreiben sogar weniger IL-18 bei Asthma bronchiale [152, 153]. *Hossny et al.* detektierten erniedrigte IL-18-Spiegel im Serum allergischer Asthmatiker im Vergleich zu gesunden Kontrollen und wiederum geringere IL-18-Spiegel in der akuten Exazerbation [154]. Auch bei IL-18 scheint der Schweregrad der Asthma-Erkrankung eine Bedeutung zu haben, so fanden sich in schwerem, refraktärem Asthma bronchiale erhöhte IL-18-Werte im Vergleich zu milde-rem Asthma [156, 157]. Auch *Tanaka et al.* beschrieben, widersprüchlich zu *Hossny et al.*, in akuten Exazerbationen erhöhte IL-18-Serumlevel im Vergleich zu Zeitpunkten der Remission [147].

Eine Erklärung für die Divergenz bezüglich Genexpression und Zytokinsekretion in dieser Arbeit können zwischengeschaltete regulierende Signalwege sein. So zum Beispiel das IL-18-Bindungsprotein (IL-18-BP). *Zhang et al.* beschrieben ein Gleichgewicht zwischen IL-18 und IL-18-BP als relevant im Asthma bronchiale. So fanden sie erhöhte Level von IL-18 als auch von IL-18-BP bei Asthma [158]. Bindung von IL-18 durch das IL-18-BP oder durch ähnliche Mechanismen könnte die Diskrepanz zwischen Genexpression und Zytokinsekretion erklären. Womöglich entziehen sich durch Bindung an Proteine Teile des Zytokins unseren Messmethoden. Weiterhin wurde hier die sezernierte IL-18-Menge gemessen. Über die intrazelluläre Konzentration von IL-18 kann keine Aussage gemacht werden. Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, ist die Kinetik des Versuchsaufbaus. Sezernierte Zytokine und Genexpression werden zum selben Zeitpunkt nach 24h Stimulation betrachtet. Die Betrachtung der Zytokinsekretion zu weiteren Zeitpunkten kann weitere Aspekte hervorbringen.

Die Stimulation mit den Staubextrakten war mit einer Suppression der IL-18-Genexpression assoziiert. Diese Suppression zeigte sich stärker bei allergischen Asthmatikern als bei gesunden Kontrollen, nach Stimulation mit den Staubextrakten glichen sich die IL-18-Genexpression allergischer Asthmatiker und gesunder Kontrollen an. *Yang et al.* beschrieben die IL-18-Serumwerte in akuten Exazerbationen vor und nach Glukokortikoidgabe. Hierbei detektierten sie vor der Glukokortikoidgabe erhöhte IL-18-Level, die nach der Glukokortikoidgabe gesunken waren. Die mit der Stimulation durch die Staubextrakte assoziierte Suppression der IL-18-Genexpression könnte auf den bereits vermuteten protektiven Effekt der Staubextrakte hindeuten. Betrachtet man die Zytokinsekretion fällt auf, dass die Stimulation durch die Staubextrakte die IL-18-Sekretion verstärkt. Auch hier muss die Kinetik der Genexpression und Zytokinsekretion berücksichtigt werden. Betrachtet wird die Genexpression sowie die Zytokinsekreti-

on zum selben Zeitpunkt. Es gilt anzunehmen, dass die Zytokinsekretion sich der Genexpression nach einer weiteren Zeitspanne anpassen würde. Wie bereits erwähnt, sind weitere Betrachtungen dieses Signalweges von Nöten, da sich ein protektiver Einfluss der Staubextrakte über den IL-18-Signalweg vermuten lässt.

Zusammenfassend betrachtet deuten die hier beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass die *PBMCs* rekrutierter Asthmatiker ohne Stimulation in einer Art empfindlichem Gleichgewicht stehen. Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Zytokinlevel von IL-1 β und IL-1 α bei gesunden Kontrollen ist, dass gesunde Kontrollen über unbekannte Mechanismen Entzündungen besser regulieren können und deshalb *per se* mehr IL-1 β und IL-1 α tolerieren. Die Stimulation mit den Staubextrakten führt zu einem Angleich der Zytokinlevel. Dieser Anstieg an IL-1 β und IL-1 α lässt sich als grundsätzlicher Marker für die Stimulation, unabhängig von protektiven oder pro-inflammatorischen Stimuli interpretieren. Zur weiteren Betrachtung dieser Hypothese steht derzeit Forschung aus.

Auch IL-18 nimmt eine Rolle im Asthma bronchiale ein und zeigt sich in der Genexpression bei allergischen Asthmatikern erhöht, auf Proteinebene jedoch vermindert. Hier zeigt sich nach Stimulation mit den Staubextrakten ein Angleich der Konzentrationen. Durch die Stimulation wird die Genexpression IL-18's in *PBMCs* allergischer Asthmatiker supprimiert. Dies könnte auf einen protektiven Einfluss der Staubextrakte auf den IL-18 Signalweg hindeuten und stellt womöglich einen entscheidenden Ansatz in der Erklärung des "Bauernhofeffektes" dar.

6.4 Vergleich der Staubextrakte

Die Stimulation mit dem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt war mit einer stärkeren Veränderung der Genexpression assoziiert, als die Stimulation mit den übrigen Staubextrakten. Die Stimulation mit dem auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenem Staubextrakt war mit der geringsten Veränderung assoziiert.

Die Staubextrakte unterschieden sich in der Richtung ihrer Effekte kaum. Es sind jedoch signifikante Unterschiede im Ausmaß der Effekte erkennbar. So fällt auf, dass die Stimulation mit dem chinesischen Staubextrakt mit deutlich geringeren Veränderungen assoziiert war, als die Stimulation mit den übrigen Staubextrakten und das deutsche Staubextrakt die größten Effekte bewirkt. Eine Erklärung der unterschiedlichen Effekte stellt die Herkunft der Studienpopulation dar. Alle Probanden stammen aus der Stadt

und dem Umkreis Münchens. Sie standen in ihrem bisherigen Leben nicht in Kontakt zu chinesischen Bauernhöfen und den dort vorherrschenden Bedingungen. Diese Überlegung könnte auch den mit dem deutschen Staubextrakt assoziierten größten Effekt erklären. Ergebnisse mit denselben Staubextrakten bei Studienpopulationen anderer Herkunft und Ethnie sind von Interesse, um diese Hypothese weiter zu betrachten. Die wahrscheinlichere Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der Staubextrakte ist jedoch eine nicht identische Durchführung der Staubsammlung. Trotz standardisierter Verfahren ist davon auszugehen, dass in den Prozessschritten der Staubsammlung Unterschiede und Fehler auftreten. So können kürzere Liegezeiten oder falsches Asservieren die Erklärung für fehlende Effekte sein. Bei Detektion der LPS-Menge in den Staubextrakten konnte festgestellt werden, dass das chinesische Staubextrakt deutlich geringere Mengen an LPS aufweist als die übrigen Staubextrakte [mündliche Kommunikation, Daten bisher nicht veröffentlicht]. Aufgrund der reduzierten LPS-Menge in dem auf einem chinesischen Bauernhof gesammelten Staubextrakt ist davon auszugehen, dass in den Staubextrakten der chinesischen Bauernhöfe insgesamt eine deutlich geringere Menge an mikrobiellen Bestandteilen enthalten ist. Es bleibt dennoch von Interesse, welche Ergebnisse die Stimulation mit den unterschiedlichen Staubextrakten in weiteren Studienpopulationen liefern. Dass in der vorliegenden Arbeit die Stimulation mit dem deutschen Staubextrakt mit den größten Effekten assoziiert war, auch im Vergleich zum finnischen und amischen Staubextrakt, lässt vermuten, dass die Reaktion der *PBMCs* sich je nach Umweltexposition der Kinder vor Probenentnahme unterscheiden könnte. Dies lässt eine Relevanz für die Frequenz und den Zeitpunkt der Stimulation mit der Bauernhofumgebung im Kindesalter deutlich werden. Weitere Untersuchungen zu der Rolle des Inflammasoms im "Bauernhofeffekt" und den zugehörigen Zytokinen vor allem in Betracht auf den Zeitpunkt der Stimulation könnten hier weitere Zusammenhänge erkennen lassen und die bereits gewonnenen Erkenntnisse in einen Gesamtkontext setzen.

6.5 Limitationen

Die Studie weist einige Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf die Rolle des Immunoproteasoms und Inflammasoms beim Asthma und der Asthmaprotektion beachtet werden müssen. Bekannt ist, dass die Staubextrakte unter anderem LPS enthalten. LPS wurde bereits als Aktivator des NLRP3-Inflammasoms beschrieben. So führte LPS Stimulation in Mäusen zu erhöhter IL-1 β - und IL-18-

Sekretion sowie zu erhöhter Neutrophileninfiltration und akutem Lungenschaden [160]. Weiterhin induzierte LPS in murinen Makrophagen und humanen Monozyten NLRP3-Inflammasom abhängig die IL-1 β - und IL-18-Sekretion [161, 162]. In humanen bronchialen Epithelzellkulturen war die Stimulation mit LPS mit einer signifikanten Erhöhung NLRP3s und IL-1 β s assoziiert [117]. LPS-Inhalation führte bei allergischen Asthmatikern zur Genexpressionserhöhung von IL-1 β und CASP1 sowie zur Aktivierung des Immunsystems [164]. Die größte Limitation dieser Arbeit ist es daher, dass viele der beobachteten Effekte eventuell auf den Effekt von LPS zurückzuführen sind und unklar bleibt welche weiteren Inhaltsstoffe die Effekte verantworten und wie groß diese Effekte sind. Gegen LPS als alleinige Ursache für die Beobachtungen spricht jedoch, dass *Hernandez et al.* beschreiben, dass LPS-Inhalation bei gesunden Kontrollen zu einer stärkeren IL-1 β - und IL-18-Produktion führte, als bei allergischen Asthmatikern [165]. Dies widerspricht unseren Beobachtungen, bei denen allergische Asthmatischer stärker auf die Stimulation mit Staubextrakten reagierten, als gesunde Kontrollen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben LPS andere wichtige immunmodulatorische Inhaltsstoffe im Staubextrakt enthalten sind [127]. Um Klarheit zu schaffen inwiefern die Effekte der Staubextrakte auf LPS oder anderen Inhaltsstoffen begründet sind, ist weitere Forschung nötig. So könnten durch die Fraktionierung der Staubextrakte weitere Erkenntnisse über den Einfluss einzelner Komponenten auf das Inflammasom gewonnen werden.

Ein weiterer limitierender Punkt bezüglich der Aussagekraft der Rolle des Inflammasoms und Immunoproteasoms beim "Bauernhofeffekt", besteht in der Kongruenz der Studienkohorte. Alle Probanden sind vor allem in der Stadt München und Umgebung aufgewachsen. In unzähligen Studien zeigte sich ein protektiver Effekt vor allem für Kinder, die auf Bauernhöfen aufgewachsen sind (zusammengefasst in *von Mutius et al.* [25]). Es wäre von Interesse, wie sich die Regulation des Immunoproteasoms und Inflammasoms unter Stimulation mit den Staubextrakten in *PBMCs* von auf Bauernhöfen aufgewachsenen Kindern verhält und dies im Vergleich zu allergischen Asthmatikern zu betrachten. Diese Kinder kamen bereits in der Zeit der Immunsystementwicklung mit entsprechenden Inhaltsstoffen der Staubextrakte in Kontakt und könnten veränderte Effekte in Genexpression und Zytokinsekretion zeigen. Weiterhin wäre interessant, welche Rolle das Immunoproteasom und Inflammasom bei Kindern mit schwerem Asthma oder unter Exazerbation einnehmen und ob die Stimulation mit den Staubextrakten zu diesem Zeitpunkt einen veränderten Effekt zeigt. Zu diesem Thema werden bereits For-

schungen in unserer Arbeitsgruppe weitergeführt. Die Variable des Zeitpunktes der Stimulation führt zu einem weiteren wichtigen Punkt. Die Probanden unserer Studie zeigen mit 4-14 Jahren eine große Altersspanne und somit auch einen unterschiedlichen Entwicklungsgrad ihres Immunsystems. Wir konnten bereits einen Unterschied bei regulatorischen T-Zellen zwischen dem Alter 4,5 und 6 Jahre feststellen [14]. Um die Rolle des Inflammasoms und Immunoproteasoms beim "Bauernhofeffekt" weiter spezifizieren zu können, wäre eine altersspezifischere Betrachtung von Interesse. Zudem wurde die Stimulation der *PBMCs* nur einmalig durchgeführt. Es wurde bereits aufgezeigt, dass IL-1 β und IL-1 α in der Entstehung des Asthma bronchiale eine Rolle einnehmen können, dies aber gegebenenfalls vom Zeitpunkt abhängt. *Ritter et al.* blockierten IL-1 β mittels dem Interleukin-1 Rezeptorantagonist Anakinra im murinen Modell und fanden Unterschiede in der Auswirkung abhängig vom Zeitpunkt der Blockierung [66]. *Riedler et al.* fanden den größten protektiven Effekt der Bauernhofumgebung bei Kontakt zu Ställen und unverarbeiteter Kuhmilch im ersten Lebensjahr, auch im Vergleich zu späteren Kontakten [166]. In weiteren Studien im Mausmodell zeigten sich protektive Effekte für die Stimulation mit Staubextrakten abhängig vom richtigen Zeitpunkt: So führte die Inhalation von Bauernhofstaubextrakten während der Sensibilisierung von Mäusen im OVA-Asthma-Modell zu einem protektiven Effekt. Es zeigten sich weniger IgE und IgG im Serum sowie weniger Eosinophile, Lymphozyten, Makrophagen und IgE in der BAL [73]. Viele Inhaltsstoffe von Bauernhofstaubextrakten, so z.B. *Bacillus licheniformis*-Sporen oder *Acinetobacter Iwoffii* F78 zeigten ebenso protektive Effekte bei früher Stimulation [167-170]. Dies deutet darauf hin, dass der Zeitpunkt der Stimulation eine große Bedeutung hat. IL-1 α führte bei *Caucig et al.* während der T-Zell-Sensibilisierung zu verringerten Symptomen im OVA-Asthma-Modell, während es im späteren Krankheitsverlauf keine oder sogar pro-inflammatorische Effekte zeigt [141]. Die Stimulation mit den Staubextrakten führte in unserer Studie zur IL-1 α -Sekretion. Dies könnte auf einen Inflammasom-abhängigen protektiven Effekt hindeuten. Es wäre von Interesse, die Auswirkungen der Stimulation mit Staubextrakten in einem repetitiven Versuchsaufbau zu betrachten und so weitere Hinweise für die Bedeutung der Interleukine 1 β und 1 α bei Asthma bronchiale zu gewinnen.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass die hier aufgeführten Versuche in aus Blut gewonnenen *PBMCs* durchgeführt wurden. Dies lässt keine Aussagen über lokale Vorgänge im Respirationstrakt zu. Aufgrund ethischer Aspekte ist eine BAL bei Kindern jedoch für Forschungszwecke nicht durchführbar und bei Asthma bronchiale in den

wenigsten Fällen medizinisch indiziert und die Möglichkeiten somit deutlich eingeschränkt. Da das NLRP3-Inflammasom aber in diversen Zelltypen des Immunsystems beschrieben wurde, so in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B und T Zellen [60] und Asthma bronchiale eine systemische Erkrankung darstellt, können die hier gewonnene Erkenntnisse durchaus auf eine Rolle des Inflammasom und der Interleukine 1 β , 1 α und 18 in den protektiven Mechanismen der Bauernhofumgebung hindeuten.

6.6 Ausblick zur Asthmaprotektion

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass die Interleukine 1 β , 1 α und vor allem Interleukin 18 am pathophysiologischen Mechanismus des Asthma bronchiale sowie der Asthmaprotektion beteiligt sind. Inwieweit die Regulation von Interleukin 1 β und Interleukin 1 α vom Schweregrad des Asthma abhängig ist, und womöglich vor allem in Exazerbationen eine Rolle spielt, werden aktuell in der AG laufende Forschungsprojekte zeigen. Die Stimulation mit den auf Bauernhöfen gewonnenen Staubextrakten war mit einem Angleichen der zuvor bestehenden Unterschiede zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen in der Genexpression der Interleukine 1 β , 18 und 1 α assoziiert. Hierbei zeigte sich die Genexpression und Sekretion von IL-1 β und IL-1 α gesteigert, dies lässt sich als grundsätzliche Stimulation des Immunsystems verstehen. Von größerem Interesse für die Frage der Asthmaprotektion ist, dass die IL-18 Genexpression durch die Stimulation mit den Staubextrakten supprimiert wird, dies kann als möglicher protektiver Effekt der Staubextrakte gesehen werden. Deutlich wird, dass die Stimulation mit den Staubextrakten mit einer Modulation des Inflammasom-Signalweges assoziiert ist. Auch der Signalweg des Immunoproteasoms wird durch die Stimulation mit den Staubextrakten moduliert, hier zeigt sich eine deutliche Immunoproteasom Supprimierung und Proteasom Aktivierung. Dies alles deutet auf eine Rolle des Inflammasoms und Immunoproteasom in der Asthmaentstehung und Asthmaprotektion hin. Um diese Mechanismen jedoch genauer zu begreifen, ist weiterführende Forschung nötig. Ein Aspekt ist hierbei besonders von Interesse. Es bedarf weiterer Forschung bezüglich der zeitlichen Komponente der Stimulationseffekte. Wie bereits beschrieben scheint es einen Unterschied zu machen, in welchem Entwicklungsstadium das Immunsystem mit den immunmodulatorischen Inhaltsstoffen der Staubextrakte in Kontakt kommt. Hierzu wird es interessant sein, zu sehen, wie sich die Ergebnisse bzgl. IL-1 β , IL-1 α und IL-18 bei mehrmaliger Stimulation mit den Staubextrakten unterscheiden. Hierzu werden auch *in vitro* Zellkultur Experimente von Interes-

se sein, um eine mehrmalige Stimulation technisch zu ermöglichen. Diese Arbeit gibt erste Hinweise auf eine mögliche Rolle des NLRP3-Inflammasoms, der zugehörigen Zytokine der Interleukin-1-Familie und des Immunoproteasoms beim "Bauernhofeffekt" und zeigt viele interessante Aspekte die in anschließender Forschung weiter ergründet werden sollten.

7 Zusammenfassung

Aufgrund der steigenden Prävalenz des Asthma bronchiale in der westlichen Welt, dem hohen Leidensdruck sowie den steigenden Kosten sind neue Therapiemöglichkeiten und präventive Konzepte dringend gefragt. Das Aufwachsen auf einem Bauernhof ist dabei der stärkste bekannte protektive Effekt. Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen erkranken um ein Vielfaches seltener an Asthma als Kinder, die in Städten aufwachsen. Eine veränderte T-Zellantwort mit gesteigerter Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen ist hierbei von Bedeutung. Das Immunoproteasom und Inflammasom stehen in Zusammenhang mit der Regulierung der T-Zellantwort, so führt die Inhibition des Immunoproteasoms zu einer verstärkten Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen und das Inflammasom verstärkt die TH2-Zellantwort. **Ziel dieses Projekts war es, die Rolle des Inflammasoms sowie Immunoproteasoms beim Asthma bronchiale zu untersuchen und die Bedeutung für den protektiven Einfluss der Bauernhofumgebung zu evaluieren.**

Hierfür wurden allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen im Kindesalter zwischen 4-14 Jahren rekrutiert. Neben einem Fragebogen zur Erfassung sozioökonomischer Daten wurde Blut zur Isolation von *PBMCs* gewonnen. Weiterhin wurden Staubextrakte auf Bauernhöfen in Deutschland, Finnland, China und bei den Amischen, einer traditionell lebenden Bevölkerungsgruppe in den USA, gesammelt, gefiltert und destilliert. Die *PBMCs* wurden 24h mit den Staubextrakten stimuliert. Anschließend wurde mittels *qPCR* die Genexpression sowie mittels Immunoassay die Zytokinsekretion betrachtet.

Hierbei fiel kein Unterschied in der Genexpression des Immunoproteasoms zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen auf. Durch die Stimulation mit den Staubextrakten wurde die Genexpression von Markern des Immunoproteasoms jedoch supprimiert. Die Staubextrakte könnten somit über die Suppression des Immunoproteasoms protektiv wirken. Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen unterschieden sich nicht in ihrer Reaktion auf die Staubextrakte.

Die Genexpression des NLRP3-Inflammasoms zeigte *per se* keinen Unterschied zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen. Gesunde Kontrollen zeigten jedoch sowohl in der Genexpression als auch auf Proteinebene signifikant mehr IL-1 β und IL-1 α . IL-18 zeigte sich bei allergischen Asthmatikern in der Genexpression erhöht,

auf Proteinebene jedoch erniedrigt. Durch die Stimulation mit den Staubextrakten wurde die Genexpression von Markern des Inflammasoms und der Interleukine 1 β und 1 α erhöht. Allergische Asthmatiker zeigten eine verstärkte Reaktion auf die Stimulation und so glichen sich die Genexpressionen von IL-1 β und IL-1 α unter Stimulation zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen an. Die Interleukin 18 Genexpression zeigte sich nach Stimulation mit den Staubextrakten jedoch supprimiert. **Die Ergebnisse lassen auf eine Rolle des Signalweges des Inflammasoms im Asthma bronchiale und im "Bauernhofeffekt" schließen, vor allem die Supprimierung von IL-18 unter Staubstimulation ist von großem Interesse.** Die Bedeutung des Inflammasoms bei Asthma unterscheidet sich womöglich je nach Schweregrad der Erkrankung. Dies muss weiter untersucht werden. Von Interesse bleibt außerdem welche Rolle der Zeitpunkt der Stimulation mit Staubextrakten für die Entstehung des Asthma bronchiale spielt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier gewonnenen Erkenntnisse auf eine Rolle des Immunoproteasoms, des Inflammasom und der Interleukine 1 β , 1 α und 18 in den protektiven Mechanismen der Bauernhofumgebung hindeuten.

8 Literatur

1. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The immunology of asthma*. Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 45-56.
2. The Global Asthma Report 2018. Auckland, N.Z.G.A.N., 2018.
3. The Global Asthma Report 2014. Auckland, N.Z.G. and Asthma Network.
4. Adami, A.J. and S.J. Bracken, *Breathing Better Through Bugs: Asthma and the Microbiome*. Yale J Biol Med, 2016. **89**(3): p. 309-324.
5. Zvezdin, B., et al., *Allergic asthma and rhinitis comorbidity*. Vojnosanit Pregl, 2015. **72**(11): p. 1024-31.
6. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
7. Yang, Y.L., et al., *Regulatory T cells and Th1/Th2 in peripheral blood and their roles in asthmatic children*. Transl Pediatr, 2013. **2**(1): p. 27-33.
8. Hirose, K., et al., *Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway*. Immunol Rev, 2017. **278**(1): p. 145-161.
9. Chatila, T.A., *Role of regulatory T cells in human diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 949-59; quiz 960.
10. Schaub, B., et al., *Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1491-9, 1499 e1-13.
11. Hartl, D., et al., *Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1258-66.
12. Lin, Y.L., C.C. Shieh, and J.Y. Wang, *The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation*. Allergy, 2008. **63**(1): p. 67-74.
13. Ling, E.M., et al., *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease*. Lancet, 2004. **363**(9409): p. 608-15.
14. Schroder, P.C., et al., *A switch in regulatory T cells through farm exposure during immune maturation in childhood*. Allergy, 2017. **72**(4): p. 604-615.
15. Raedler, D., et al., *Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(1): p. 81-91.
16. Barczyk, A., et al., *Decreased percentage of CD4(+)Foxp3(+)TGF-beta(+) and increased percentage of CD4(+)IL-17(+) cells in bronchoalveolar lavage of asthmatics*. J Inflamm (Lond), 2014. **11**: p. 22.
17. Smyth, L.J., et al., *Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects*. Chest, 2010. **138**(4): p. 905-12.

18. Wang, L.H., et al., *Insufficient increment of CD4+CD25+ regulatory T cells after stimulation in vitro with allergen in allergic asthma*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009. **148**(3): p. 199-210.
19. Shi, Y.H., et al., *An increased ratio of Th2/Treg cells in patients with moderate to severe asthma*. *Chin Med J (Engl)*, 2013. **126**(12): p. 2248-53.
20. Anto, J.M., et al., *Mechanisms of the Development of Allergy (MeDALL): Introducing novel concepts in allergy phenotypes*. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. **139**(2): p. 388-399.
21. Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius, *The asthma epidemic*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(21): p. 2226-35.
22. Vartiainen, E., et al., *Allergic diseases, skin prick test responses, and IgE levels in North Karelia, Finland, and the Republic of Karelia, Russia*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(4): p. 643-8.
23. von Mutius, E., et al., *Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **149**(2 Pt 1): p. 358-64.
24. Kramer, U., et al., *What can reunification of East and West Germany tell us about the cause of the allergy epidemic?* *Clin Exp Allergy*, 2015. **45**(1): p. 94-107.
25. von Mutius, E. and D. Vercelli, *Farm living: effects on childhood asthma and allergy*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(12): p. 861-8.
26. von Mutius, E. and K. Radon, *Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2008. **28**(3): p. 631-47, ix-x.
27. Ma, Y., et al., *Very low prevalence of asthma and allergies in schoolchildren from rural Beijing, China*. *Pediatr Pulmonol*, 2009. **44**(8): p. 793-9.
28. Stein, M.M., et al., *Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(5): p. 411-21.
29. Douwes, J., et al., *Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema*. *Eur Respir J*, 2008. **32**(3): p. 603-11.
30. Schroder, P.C., et al., *The rural-urban enigma of allergy: what can we learn from studies around the world?* *Pediatr Allergy Immunol*, 2015. **26**(2): p. 95-102.
31. Sullivan, A., et al., *'The Microbiome and the Pathophysiology of Asthma'*. *Respir Res*, 2016. **17**(1): p. 163.
32. Earl, C.S., S.Q. An, and R.P. Ryan, *The changing face of asthma and its relation with microbes*. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(7): p. 408-18.
33. Zimmermann, P., et al., *Association between the intestinal microbiota and allergic sensitization, eczema, and asthma: A systematic review*. *J Allergy Clin Immunol*, 2018.
34. Loo, E.X.L., et al., *Comparison of microbiota and allergen profile in house dust from homes of allergic and non-allergic subjects- results from the GUSTO study*. *World Allergy Organ J*, 2018. **11**(1): p. 37.

35. Ege, M.J., et al., *Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma*. N Engl J Med, 2011. **364**(8): p. 701-9.
36. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.
37. Schuijs, M.J., et al., *Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells*. Science, 2015. **349**(6252): p. 1106-10.
38. Schaub, B., et al., *Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(4): p. 774-82 e5.
39. Lluís, A., et al., *Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 551-9.
40. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
41. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. Science, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
42. Atarashi, K., et al., *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*. Nature, 2013. **500**(7461): p. 232-6.
43. Oertli, M., et al., *DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine Helicobacter pylori-specific immune tolerance, and asthma protection*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 1082-96.
44. Kniepert, A. and M. Groettrup, *The unique functions of tissue-specific proteasomes*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(1): p. 17-24.
45. Kimura, H., et al., *New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 541984.
46. Huber, E.M., et al., *Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity*. Cell, 2012. **148**(4): p. 727-38.
47. McCarthy, M.K. and J.B. Weinberg, *The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 21.
48. de Verteuil, D., et al., *Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(9): p. 2034-47.
49. Basler, M., C.J. Kirk, and M. Groettrup, *The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 74-80.
50. Muchamuel, T., et al., *A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis*. Nat Med, 2009. **15**(7): p. 781-7.

51. Kalim, K.W., et al., *Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 4182-93.
52. Elliott, P.J., et al., *Proteasome inhibition: A novel mechanism to combat asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(2 Pt 1): p. 294-300.
53. Wegmann, M., et al., *Long-term bortezomib treatment reduces allergen-specific IgE but fails to ameliorate chronic asthma in mice*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. **158**(1): p. 43-53.
54. Volkov, A., et al., *beta5i subunit deficiency of the immunoproteasome leads to reduced Th2 response in OVA induced acute asthma*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60565.
55. Haspeslagh, E., et al., *Murine Models of Allergic Asthma*. Methods Mol Biol, 2017. **1559**: p. 121-136.
56. Doitsh, G., et al., *Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 509-14.
57. De Nardo, D., C.M. De Nardo, and E. Latz, *New insights into mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome and its role in lung disease*. Am J Pathol, 2014. **184**(1): p. 42-54.
58. Ather, J.L., et al., *Inflammasome Activity in Non-Microbial Lung Inflammation*. J Environ Immunol Toxicol, 2014. **1**(3): p. 108-117.
59. Kim, S.R., et al., *NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial ROS in bronchial epithelial cells is required for allergic inflammation*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1498.
60. Im, H. and A.J. Ammit, *The NLRP3 inflammasome: role in airway inflammation*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(2): p. 160-72.
61. Xiao, Y., W. Xu, and W. Su, *NLRP3 inflammasome: A likely target for the treatment of allergic diseases*. Clin Exp Allergy, 2018. **48**(9): p. 1080-1091.
62. Moffatt, M.F., et al., *A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma*. N Engl J Med, 2010. **363**(13): p. 1211-1221.
63. Hitomi, Y., et al., *Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 779-85 e6.
64. Besnard, A.G., et al., *NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant*. Allergy, 2011. **66**(8): p. 1047-57.
65. Idzko, M., et al., *Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 913-9.
66. Ritter, M., et al., *Functional relevance of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin (IL)-1beta during acute allergic airway inflammation*. Clin Exp Immunol, 2014. **178**(2): p. 212-23.
67. Thomas, S.S. and S.K. Chhabra, *A study on the serum levels of interleukin-1beta in bronchial asthma*. J Indian Med Assoc, 2003. **101**(5): p. 282, 284, 286 passim.

68. Birrell, M.A. and S. Eltom, *The role of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of airway disease*. *Pharmacol Ther*, 2011. **130**(3): p. 364-70.
69. Ando, M. and M. Shima, *Serum interleukins 12 and 18 and immunoglobulin E concentrations and allergic symptoms in Japanese schoolchildren*. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2007. **17**(1): p. 14-9.
70. Greaney, A.J., S.H. Leppla, and M. Moayeri, *Bacterial Exotoxins and the Inflammasome*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 570.
71. Shin, S. and I.E. Brodsky, *The inflammasome: Learning from bacterial evasion strategies*. *Semin Immunol*, 2015. **27**(2): p. 102-10.
72. Hirota, J.A., et al., *The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **129**(4): p. 1116-25 e6.
73. Peters, M., et al., *Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. *Thorax*, 2006. **61**(2): p. 134-9.
74. Sherenian, M.G., Y. Wang, and P.C. Fulkerson, *Hospital admission associates with higher total IgE level in pediatric patients with asthma*. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2015. **3**(4): p. 602-3 e1.
75. and, G.I.f.A.G.S.f.A.M. and Prevention.
76. Matucci, A., et al., *Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question?* *Respir Res*, 2018. **19**(1): p. 113.
77. Heffler, E., et al., *The Severe Asthma Network in Italy: Findings and Perspectives*. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2018.
78. Sattler, C., G. Garcia, and M. Humbert, *Novel targets of omalizumab in asthma*. *Curr Opin Pulm Med*, 2017. **23**(1): p. 56-61.
79. Silverberg, J.I., et al., *Association of atopic dermatitis with allergic, autoimmune, and cardiovascular comorbidities in US adults*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2018. **121**(5): p. 604-612 e3.
80. Ballardini, N., et al., *Development and comorbidity of eczema, asthma and rhinitis to age 12: data from the BAMSE birth cohort*. *Allergy*, 2012. **67**(4): p. 537-44.
81. Hopper, J.L., et al., *Does eczema in infancy cause hay fever, asthma, or both in childhood? Insights from a novel regression model of sibling data*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **130**(5): p. 1117-1122 e1.
82. Pinart, M., et al., *Comorbidity of eczema, rhinitis, and asthma in IgE-sensitised and non-IgE-sensitised children in MeDALL: a population-based cohort study*. *Lancet Respir Med*, 2014. **2**(2): p. 131-40.
83. Spergel, J.M., *From atopic dermatitis to asthma: the atopic march*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2010. **105**(2): p. 99-106; quiz 107-9, 117.

84. Liu, M., et al., *History of eczema is associated with more severe hospital course in children hospitalized for asthma*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2018. **121**(6): p. 735-736.
85. Malka, J., et al., *Eczema and race as combined determinants for differential response to step-up asthma therapy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. **134**(2): p. 483-5.
86. Aguilar, D., et al., *Computational analysis of multimorbidity between asthma, eczema and rhinitis*. *PLoS One*, 2017. **12**(6): p. e0179125.
87. Hallit, S., et al., *The AAA Risk Factors Scale: A New Model to Screen for the Risk of Asthma, Allergic Rhinitis and Atopic Dermatitis in Children*. *Med Princ Pract*, 2018. **27**(5): p. 472-480.
88. Tormanen, S., et al., *Risk factors for asthma after infant bronchiolitis*. *Allergy*, 2018. **73**(4): p. 916-922.
89. Wen, H.J., et al., *Predicting risk for childhood asthma by pre-pregnancy, perinatal, and postnatal factors*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2015. **26**(3): p. 272-279.
90. Illi, S., et al., *Perinatal influences on the development of asthma and atopy in childhood*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2014. **112**(2): p. 132-139 e1.
91. Schmitz, R., K. Atzpodien, and M. Schlaud, *Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2012. **23**(8): p. 716-23.
92. Schlaud, M., K. Atzpodien, and W. Thierfelder, *[Allergic diseases. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2007. **50**(5-6): p. 701-10.
93. Egbuonu, L. and Starfield, *Child health and social status*. *Pediatrics*, 1982. **69**(5): p. 550-7.
94. Braback, L., A. Hjern, and F. Rasmussen, *Social class in asthma and allergic rhinitis: a national cohort study over three decades*. *Eur Respir J*, 2005. **26**(6): p. 1064-8.
95. Mielck, A., P. Reitmeir, and M. Wjst, *Severity of childhood asthma by socioeconomic status*. *Int J Epidemiol*, 1996. **25**(2): p. 388-93.
96. Almqvist, C., G. Pershagen, and M. Wickman, *Low socioeconomic status as a risk factor for asthma, rhinitis and sensitization at 4 years in a birth cohort*. *Clin Exp Allergy*, 2005. **35**(5): p. 612-8.
97. Westergaard, T., et al., *Sibship characteristics and risk of allergic rhinitis and asthma*. *Am J Epidemiol*, 2005. **162**(2): p. 125-32.
98. McKeever, T.M., et al., *Siblings, multiple births, and the incidence of allergic disease: a birth cohort study using the West Midlands general practice research database*. *Thorax*, 2001. **56**(10): p. 758-62.
99. Karmaus, W. and C. Botezan, *Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review*. *J Epidemiol Community Health*, 2002. **56**(3): p. 209-17.

100. von Mutius, E., et al., *Skin test reactivity and number of siblings*. BMJ, 1994. **308**(6930): p. 692-5.
101. Kikkawa, T., et al., *Birth order and paediatric allergic disease: A nationwide longitudinal survey*. Clin Exp Allergy, 2018. **48**(5): p. 577-585.
102. Strachan, D.P., et al., *Siblings, asthma, rhinoconjunctivitis and eczema: a worldwide perspective from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood*. Clin Exp Allergy, 2015. **45**(1): p. 126-36.
103. Genuneit, J., et al., *The combined effects of family size and farm exposure on childhood hay fever and atopy*. Pediatr Allergy Immunol, 2013. **24**(3): p. 293-8.
104. Cullinan, P., *Childhood allergies, birth order and family size*. Thorax, 2006. **61**(1): p. 3-5.
105. Kragh, M., et al., *Divergent response profile in activated cord blood T cells from first-born child implies birth-order-associated in utero immune programming*. Allergy, 2016. **71**(3): p. 323-32.
106. Baker, T.A., et al., *Proteasomes in lungs from organ donors and patients with end-stage pulmonary diseases*. Physiol Res, 2014. **63**(3): p. 311-9.
107. Keller, I.E., et al., *Regulation of immunoproteasome function in the lung*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10230.
108. Noda, C., et al., *Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(2): p. 348-54.
109. Egerer, T., et al., *Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1501-8.
110. Schmidt, N., et al., *Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis*. Gut, 2010. **59**(7): p. 896-906.
111. Reis, J., et al., *LPS-induced formation of immunoproteasomes: TNF-alpha and nitric oxide production are regulated by altered composition of proteasome-active sites*. Cell Biochem Biophys, 2011. **60**(1-2): p. 77-88.
112. Silswal, N., et al., *Of Mice and Men: Proteasome's Role in LPS-Induced Inflammation and Tolerance*. Shock, 2017. **47**(4): p. 445-454.
113. Primiano, M.J., et al., *Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation*. J Immunol, 2016. **197**(6): p. 2421-33.
114. Eisenbarth, S.C., et al., *Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1122-6.
115. Brickey, W.J., et al., *Sputum inflammatory cells from patients with allergic rhinitis and asthma have decreased inflammasome gene expression*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(4): p. 900-3.

116. Allen, I.C., et al., *Analysis of NLRP3 in the development of allergic airway disease in mice*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2884-93.
117. Tran, H.B., et al., *Immunolocalization of NLRP3 Inflammasome in Normal Murine Airway Epithelium and Changes following Induction of Ovalbumin-Induced Airway Inflammation*. J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 819176.
118. Wang, L., et al., *Sevoflurane Inhibits the Th2 Response and NLRP3 Expression in Murine Allergic Airway Inflammation*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 9021037.
119. Bruchard, M., et al., *The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation*. Nat Immunol, 2015. **16**(8): p. 859-70.
120. Simpson, J.L., et al., *Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma*. Eur Respir J, 2014. **43**(4): p. 1067-76.
121. Kim, R.Y., et al., *Role for NLRP3 Inflammasome-mediated, IL-1beta-Dependent Responses in Severe, Steroid-Resistant Asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **196**(3): p. 283-297.
122. Rossios, C., et al., *Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(2): p. 560-570.
123. Kanneganti, T.D., et al., *Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 233-6.
124. Hari, A., et al., *Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7281.
125. Kim, B.G., et al., *Effect of TiO(2) Nanoparticles on Inflammasome-Mediated Airway Inflammation and Responsiveness*. Allergy Asthma Immunol Res, 2017. **9**(3): p. 257-264.
126. Yazdi, A.S., et al., *Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19449-54.
127. Krusche, J., et al., *TNFAIP3 is a key player in childhood asthma development and environment-mediated protection*. J Allergy Clin Immunol, 2019.
128. Konno, S., et al., *Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **109**(1): p. 73-8.
129. Broide, D.H., et al., *Cytokines in symptomatic asthma airways*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(5): p. 958-67.
130. Sobkowiak, P., et al., *Interleukin 1beta polymorphism and serum level are associated with pediatric asthma*. Pediatr Pulmonol, 2017. **52**(12): p. 1565-1571.
131. Sousa, A.R., et al., *Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(4 Pt 1): p. 1061-6.

132. Nakae, S., et al., *IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response*. *Int Immunol*, 2003. **15**(4): p. 483-90.
133. Broide, D.H., et al., *Inhibition of eosinophilic inflammation in allergen-challenged, IL-1 receptor type 1-deficient mice is associated with reduced eosinophil rolling and adhesion on vascular endothelium*. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 263-9.
134. Sousa, A.R., et al., *Effect of inhaled glucocorticoids on IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) expression in asthmatic bronchial epithelium*. *Thorax*, 1997. **52**(5): p. 407-10.
135. Hastie, A.T., et al., *Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(5): p. 1028-1036 e13.
136. Pellegrino, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. Two possible mediators of allergic inflammation*. *Minerva Pediatr*, 1996. **48**(7-8): p. 309-12.
137. Tillie-Leblond, I., et al., *Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **159**(2): p. 487-94.
138. Fettelschoss, A., et al., *Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(44): p. 18055-60.
139. Gross, O., et al., *Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1*. *Immunity*, 2012. **36**(3): p. 388-400.
140. Kamari, Y., et al., *Reduced atherosclerosis and inflammatory cytokines in apolipoprotein-E-deficient mice lacking bone marrow-derived interleukin-1alpha*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **405**(2): p. 197-203.
141. Caucig, P., et al., *Dual role of interleukin-1alpha in delayed-type hypersensitivity and airway hyperresponsiveness*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010. **152**(4): p. 303-12.
142. Willart, M.A., et al., *Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33*. *J Exp Med*, 2012. **209**(8): p. 1505-17.
143. Noma, T., et al., *Reduced IL-1 production in adolescents with mite antigen asthma in remission*. *Clin Exp Immunol*, 1998. **113**(1): p. 10-6.
144. Wild, J.S., et al., *IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma*. *J Immunol*, 2000. **164**(5): p. 2701-10.
145. Imaoka, H., et al., *Interleukin-18 and interleukin-18 receptor-alpha expression in allergic asthma*. *Eur Respir J*, 2011. **38**(4): p. 981-3.
146. Wong, C.K., et al., *Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **125**(2): p. 177-83.

147. Tanaka, H., et al., *IL-18 might reflect disease activity in mild and moderate asthma exacerbation*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(2): p. 331-6.
148. Imaoka, H., et al., *Increased serum levels of soluble IL-18 receptor complex in patients with allergic asthma*. Allergol Int, 2013. **62**(4): p. 513-5.
149. Yamagata, S., et al., *Interleukin-18-deficient mice exhibit diminished chronic inflammation and airway remodelling in ovalbumin-induced asthma model*. Clin Exp Immunol, 2008. **154**(3): p. 295-304.
150. Rovina, N., et al., *IL-18 in induced sputum and airway hyperresponsiveness in mild asthmatics: effect of smoking*. Respir Med, 2009. **103**(12): p. 1919-25.
151. Hartwig, C., et al., *Endogenous IL-18 in experimentally induced asthma affects cytokine serum levels but is irrelevant for clinical symptoms*. Cytokine, 2008. **42**(3): p. 298-305.
152. Ho, L.P., et al., *Reduced interleukin-18 levels in BAL specimens from patients with asthma compared to patients with sarcoidosis and healthy control subjects*. Chest, 2002. **121**(5): p. 1421-6.
153. Cebeci, A.N., et al., *The role of IL-18 in Th1/Th2 balance in children*. Allergy Asthma Proc, 2006. **27**(4): p. 365-70.
154. Hossny, E.M., et al., *Serum interleukin-18 expression in children with bronchial asthma*. World Allergy Organ J, 2009. **2**(5): p. 63-8.
155. Koch, K.N., et al., *Helicobacter urease-induced activation of the TLR2/NLRP3/IL-18 axis protects against asthma*. J Clin Invest, 2015. **125**(8): p. 3297-302.
156. Rovina, N., et al., *Low interleukin (IL)-18 levels in sputum supernatants of patients with severe refractory asthma*. Respir Med, 2015. **109**(5): p. 580-7.
157. Patil, S.P., et al., *Detection of immunological biomarkers correlated with asthma control and quality of life measurements in sera from chronic asthmatic patients*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011. **106**(3): p. 205-13.
158. Zhang, H., et al., *Role of IL-18 in atopic asthma is determined by balance of IL-18/IL-18BP/IL-18R*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(1): p. 354-373.
159. Feng, M., et al., *Associations of Early Life Exposures and Environmental Factors With Asthma Among Children in Rural and Urban Areas of Guangdong, China*. Chest, 2016. **149**(4): p. 1030-41.
160. Jiang, L., et al., *CORM-2 inhibits TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway in LPS-induced acute lung injury*. Inflamm Res, 2016. **65**(11): p. 905-915.
161. Xie, Q., et al., *Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL1beta and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells*. Int J Mol Med, 2014. **34**(1): p. 341-9.
162. Gaidt, M.M., et al., *Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway*. Immunity, 2016.
163. Baker, P.J., et al., *NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5*. Eur J Immunol, 2015. **45**(10): p. 2918-26.

164. Alexis, N.E., et al., *Development of an inhaled endotoxin challenge protocol for characterizing evoked cell surface phenotype and genomic responses of airway cells in allergic individuals*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2008. **100**(3): p. 206-15.
165. Hernandez, M.L., et al., *Atopic asthmatic patients have reduced airway inflammatory cell recruitment after inhaled endotoxin challenge compared with healthy volunteers*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **130**(4): p. 869-76 e2.
166. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. *Lancet*, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.
167. Debarry, J., et al., *Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **119**(6): p. 1514-21.
168. Conrad, M.L., et al., *Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe Acinetobacter lwoffii F78*. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 2869-77.
169. Vogel, K., et al., *Animal shed Bacillus licheniformis spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **122**(2): p. 307-12, 312 e1-8.
170. Peters, M., et al., *Arabinogalactan isolated from cowshed dust extract protects mice from allergic airway inflammation and sensitization*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **126**(3): p. 648-56 e1-4.

9 Anhang

9.1 Tabellen

Phänotyp	Gen	Stimulus	mittlere Ge- nexpressi- onsänderung (FC)	p-Wert	n
alle	<i>LMP2</i>	G	-0.42	0.007 **	42
AA	<i>LMP2</i>	G	-0.55	0.04 *	21
GK	<i>LMP2</i>	G	-0.29	0.09 ns	21
alle	<i>LMP7</i>	G	-0.85	0.03 *	44
AA	<i>LMP7</i>	G	-0.97	0.0003 ***	19
GK	<i>LMP7</i>	G	-0.75	0.27 ns	25
alle	<i>MECL1</i>	G	-0.52	0.06 ns	44
AA	<i>MECL1</i>	G	-0.78	0.0004 ***	20
GK	<i>MECL1</i>	G	-0.31	0.52 ns	24
alle	<i>PSMA3</i>	G	0.15	0.55 ns	44
AA	<i>PSMA3</i>	G	0.38	0.24 ns	19
GK	<i>PSMA3</i>	G	-0.03	0.94 ns	25
alle	<i>TAP2</i>	G	-0.61	0.05 ns	41
AA	<i>TAP2</i>	G	-1.25	0.03 *	17
GK	<i>TAP2</i>	G	-0.16	0.65 ns	24
alle	<i>LMP2</i>	Fi	0.06	0.64 ns	44
AA	<i>LMP2</i>	Fi	0.10	0.65 ns	21
GK	<i>LMP2</i>	Fi	0.03	0.87 ns	23
alle	<i>LMP7</i>	Fi	-0.51	0.09 ns	44
AA	<i>LMP7</i>	Fi	-0.77	0.04 *	19
GK	<i>LMP7</i>	Fi	-0.32	0.48 ns	25
alle	<i>MECL1</i>	Fi	-0.52	0.0003 ***	44
AA	<i>MECL1</i>	Fi	-0.55	0.01 ns	20
GK	<i>MECL1</i>	Fi	-0.49	0.01 ns	24
alle	<i>PSMA3</i>	Fi	0.84	0.002 **	45
AA	<i>PSMA3</i>	Fi	0.94	0.009 **	20
GK	<i>PSMA3</i>	Fi	0.76	0.06 ns	25
alle	<i>TAP2</i>	Fi	-0.62	0.001 **	42
AA	<i>TAP2</i>	Fi	-0.70	0.009 **	18

GK	<i>TAP2</i>	Fi	-0.55	0.04 *	24
alle	<i>LMP2</i>	CH	-0.20	0.09 ns	44
AA	<i>LMP2</i>	CH	-0.23	0.21 ns	20
GK	<i>LMP2</i>	CH	-0.18	0.27 ns	24
alle	<i>LMP7</i>	CH	-0.21	0.44 ns	42
AA	<i>LMP7</i>	CH	-0.40	0.01 *	17
GK	<i>LMP7</i>	CH	-0.07	0.87 ns	25
alle	<i>MECL1</i>	CH	-0.52	<0.0001 ****	43
AA	<i>MECL1</i>	CH	-0.60	0.005 **	19
GK	<i>MECL1</i>	CH	-0.46	0.007 **	24
alle	<i>PSMA3</i>	CH	0.42	0.07 ns	44
AA	<i>PSMA3</i>	CH	0.58	0.03 *	19
GK	<i>PSMA3</i>	CH	0.30	0.41 ns	25
alle	<i>TAP2</i>	CH	-0.53	0.004 **	41
AA	<i>TAP2</i>	CH	-0.76	0.009 **	17
GK	<i>TAP2</i>	CH	-0.37	0.12 ns	24
alle	<i>LMP2</i>	Am	-0.14	0.27 ns	44
AA	<i>LMP2</i>	Am	-0.09	0.65 ns	21
GK	<i>LMP2</i>	Am	-0.18	0.26 ns	23
alle	<i>LMP7</i>	Am	-0.32	0.26 ns	44
AA	<i>LMP7</i>	Am	-0.69	0.0002 ***	19
GK	<i>LMP7</i>	Am	-0.03	0.95 ns	25
alle	<i>MECL1</i>	Am	-0.21	0.42 ns	44
AA	<i>MECL1</i>	Am	-0.48	0.02 *	19
GK	<i>MECL1</i>	Am	-0.01	0.98 ns	25
alle	<i>PSMA3</i>	Am	0.68	0.001 **	45
AA	<i>PSMA3</i>	Am	1.00	0.001 **	20
GK	<i>PSMA3</i>	Am	0.42	0.14 ns	25
alle	<i>TAP2</i>	Am	-0.37	0.12 ns	42
AA	<i>TAP2</i>	Am	-0.79	0.006 **	17
GK	<i>TAP2</i>	Am	-0.09	0.79 ns	25
alle	<i>LMP2</i>	LPS	-0.26	0.03 *	45
AA	<i>LMP2</i>	LPS	-0.36	0.06 ns	21
GK	<i>LMP2</i>	LPS	-0.16	0.26 ns	24
alle	<i>LMP7</i>	LPS	-0.32	0.23 ns	43
AA	<i>LMP7</i>	LPS	-0.57	<0.0001 ****	18
GK	<i>LMP7</i>	LPS	-0.15	0.75 ns	25

alle	<i>MECL1</i>	LPS	-0.13	0.56 ns	44
AA	<i>MECL1</i>	LPS	-0.34	0.004 **	19
GK	<i>MECL1</i>	LPS	0.03	0.95 ns	25
alle	<i>PSMA3</i>	LPS	0.08	0.64 ns	45
AA	<i>PSMA3</i>	LPS	-0.04	0.85 ns	20
GK	<i>PSMA3</i>	LPS	0.17	0.51 ns	25
alle	<i>TAP2</i>	LPS	-0.09	0.67 ns	43
AA	<i>TAP2</i>	LPS	-0.26	0.16 ns	18
GK	<i>TAP2</i>	LPS	0.04	0.90 ns	25
alle	<i>LMP2</i>	Anti-CD3/ CD28	2.05	<0.0001 ****	45
AA	<i>LMP2</i>	Anti-CD3/ CD28	2.08	<0.0001 ****	21
GK	<i>LMP2</i>	Anti-CD3/ CD28	2.02	<0.0001 ****	24
alle	<i>LMP7</i>	Anti-CD3/ CD28	2.11	<0.0001 ****	44
AA	<i>LMP7</i>	Anti-CD3/ CD28	1.83	<0.0001 ****	19
GK	<i>LMP7</i>	Anti-CD3/ CD28	2.31	0.0001 ***	25
alle	<i>MECL1</i>	Anti-CD3/ CD28	1.61	<0.0001 ****	44
AA	<i>MECL1</i>	Anti-CD3/ CD28	1.43	<0.0001 ****	19
GK	<i>MECL1</i>	Anti-CD3/ CD28	1.74	0.0007 ***	25
alle	<i>PSMA3</i>	Anti-CD3/ CD28	3.02	<0.0001 ****	45
AA	<i>PSMA3</i>	Anti-CD3/ CD28	3.27	<0.0001 ****	20
GK	<i>PSMA3</i>	Anti-CD3/ CD28	2.83	<0.0001 ****	25
alle	<i>TAP2</i>	Anti-CD3/ CD28	1.39	<0.0001 ****	42
AA	<i>TAP2</i>	Anti-CD3/ CD28	1.49	<0.0001 ****	18

GK	<i>TAP2</i>	Anti-CD3/ CD28	1.31	0.003 **	24
----	-------------	-------------------	------	-----------------	----

Tabelle 17: Änderung der Genexpression des Immunoproteasoms und Proteasoms durch Stimulation. Gemessen in *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation durch Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). *FC*; *fold change*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Phänotyp	Gen	Stimulus	mittlere Genexpressionsänderung (FC)	p-Wert	n
alle	<i>CASP1</i>	G	0.55	0.10 ns	43
AA	<i>CASP1</i>	G	0.33	0.25 ns	19
GK	<i>CASP1</i>	G	0.73	0.19 ns	24
alle	<i>CASP1</i>	Fi	1.34	0.0004 ***	44
AA	<i>CASP1</i>	Fi	1.23	0.0009 ***	19
GK	<i>CASP1</i>	Fi	1.42	0.02 *	25
alle	<i>CASP1</i>	CH	0.55	0.10 ns	43
AA	<i>CASP1</i>	CH	0.56	0.03 *	18
GK	<i>CASP1</i>	CH	0.54	0.32 ns	25
alle	<i>CASP1</i>	Am	0.90	0.004 **	44
AA	<i>CASP1</i>	Am	1.01	0.002 **	19
GK	<i>CASP1</i>	Am	0.81	0.10 ns	25
alle	<i>CASP1</i>	LPS	0.69	0.01 *	44
AA	<i>CASP1</i>	LPS	0.42	0.03 *	19
GK	<i>CASP1</i>	LPS	0.90	0.05 *	25
alle	<i>CASP1</i>	Anti-CD3/ CD28	1.03	0.003 **	42
AA	<i>CASP1</i>	Anti-CD3/ CD28	0.81	0.003 **	18
GK	<i>CASP1</i>	Anti-CD3/ CD28	1.20	0.04 *	24
alle	<i>CASP4</i>	G	0.37	0.20 ns	43
AA	<i>CASP4</i>	G	0.13	0.54 ns	19
GK	<i>CASP4</i>	G	0.55	0.25 ns	24
alle	<i>CASP4</i>	Fi	0.85	0.001 **	44

AA	<i>CASP4</i>	Fi	0.83	0.0003 ***	19
GK	<i>CASP4</i>	Fi	0.87	0.04 *	25
alle	<i>CASP4</i>	CH	0.09	0.72 ns	42
AA	<i>CASP4</i>	CH	-0.02	0.87 ns	17
GK	<i>CASP4</i>	CH	0.17	0.68 ns	25
alle	<i>CASP4</i>	Am	0.72	0.006 **	44
AA	<i>CASP4</i>	Am	0.64	0.002 **	19
GK	<i>CASP4</i>	Am	0.78	0.07 ns	25
alle	<i>CASP4</i>	LPS	0.70	0.005 **	44
AA	<i>CASP4</i>	LPS	0.44	0.03 *	19
GK	<i>CASP4</i>	LPS	0.90	0.03 *	25
alle	<i>CASP4</i>	Anti-CD3/ CD28	0.93	0.002 **	44
AA	<i>CASP4</i>	Anti-CD3/ CD28	0.80	0.001 **	19
GK	<i>CASP4</i>	Anti-CD3/ CD28	1.03	0.04 *	25

Tabelle 18: Änderung der Genexpression von CASP1 und CASP4 durch Stimulation. Gemessen in PBMCs gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation mit Staubextrakten gewonnen auf einem Änderung deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und einem amischen Bauernhof bei den Amischen(Am). FC; fold change. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Phänotyp	Gen	Stimulus	mittlere Genexpres- sionsände- rung (FC)	p-Wert	n
alle	<i>IL-1β</i>	G	5.62	<0.0001 ****	47
AA	<i>IL-1β</i>	G	6.94	<0.0001 ****	19
GK	<i>IL-1β</i>	G	4.64	<0.0001 ****	24
alle	<i>IL-1β</i>	Fi	6.04	<0.0001 ****	48
AA	<i>IL-1β</i>	Fi	7.54	<0.0001	19

GK	<i>IL-1β</i>	Fi	4.96	<0.0001	25

alle	<i>IL-1β</i>	CH	0.57	0.05 ns	46
AA	<i>IL-1β</i>	CH	0.97	<0.0001	17

GK	<i>IL-1β</i>	CH	0.32	0.53 ns	25
alle	<i>IL-1β</i>	Am	5.82	<0.0001	48

AA	<i>IL-1β</i>	Am	7.18	<0.0001	19

GK	<i>IL-1β</i>	Am	4.84	<0.0001	25

alle	<i>IL-1β</i>	LPS	6.02	<0.0001	48

AA	<i>IL-1β</i>	LPS	7.28	<0.0001	19

GK	<i>IL-1β</i>	LPS	5.08	<0.0001	25

alle	<i>IL-1β</i>	Anti-CD3/ CD28	4.68	<0.0001	48

AA	<i>IL-1β</i>	Anti-CD3/ CD28	6.05	<0.0001	19

GK	<i>IL-1β</i>	Anti-CD3/ CD28	3.65	<0.0001	25

alle	<i>IL-1δ</i>	G	-2.50	<0.0001	46

AA	<i>IL-1δ</i>	G	-3.19	<0.0001	18

GK	<i>IL-1δ</i>	G	-2.03	0.0001 ***	24
alle	<i>IL-1δ</i>	Fi	-2.36	<0.0001	47

AA	<i>IL-1δ</i>	Fi	-2.78	<0.0001	19

GK	<i>IL-1δ</i>	Fi	-2.03	<0.0001	24

alle	<i>IL-1δ</i>	CH	0.19	0.40 ns	47

AA	<i>IL-18</i>	CH	0.14	0.54 ns	18
GK	<i>IL-18</i>	CH	0.28	0.49 ns	25
alle	<i>IL-18</i>	Am	-2.04	<0.0001 ****	47
AA	<i>IL-18</i>	Am	-2.60	<0.0001 ****	18
GK	<i>IL-18</i>	Am	-1.61	0.0004 ***	25
alle	<i>IL-18</i>	LPS	-2.31	<0.0001 ****	44
AA	<i>IL-18</i>	LPS	-3.34	<0.0001 ****	16
GK	<i>IL-18</i>	LPS	-1.66	0.0004 ***	24
alle	<i>IL-18</i>	Anti-CD3/ CD28	-1.89	<0.0001 ****	45
AA	<i>IL-18</i>	Anti-CD3/ CD28	-2.35	<0.0001 ****	17
GK	<i>IL-18</i>	Anti-CD3/ CD28	-1.54	0.0005 ***	24
alle	<i>IL-1α</i>	G	5.81	<0.0001 ****	44
AA	<i>IL-1α</i>	G	7.65	<0.0001 ****	17
GK	<i>IL-1α</i>	G	4.43	<0.0001 ****	23
alle	<i>IL-1α</i>	Fi	6.43	<0.0001 ****	44
AA	<i>IL-1α</i>	Fi	8.27	<0.0001 ****	17
GK	<i>IL-1α</i>	Fi	5.09	<0.0001 ****	23
alle	<i>IL-1α</i>	CH	0.86	0.01 *	43
AA	<i>IL-1α</i>	CH	1.56	<0.0001 ****	16
GK	<i>IL-1α</i>	CH	0.38	0.50 ns	23
alle	<i>IL-1α</i>	Am	6.43	<0.0001 ****	44
AA	<i>IL-1α</i>	Am	8.25	<0.0001	17

GK	<i>IL-1α</i>	Am	5.08	<0.0001	23

alle	<i>IL-1α</i>	LPS	6.04	<0.0001	44

AA	<i>IL-1α</i>	LPS	7.52	<0.0001	17

GK	<i>IL-1α</i>	LPS	4.90	<0.0001	23

alle	<i>IL-1α</i>	Anti-CD3/ CD28	5.30	<0.0001	43

AA	<i>IL-1α</i>	Anti-CD3/ CD28	6.93	<0.0001	16

GK	<i>IL-1α</i>	Anti-CD3/ CD28	4.15	<0.0001	23

Tabelle 19: Änderung der Genexpression von IL-1β, IL-18 und IL-1α durch Stimulation. Gemessen in PBMCs gesunder Kontrollen (GK) und allergischer Asthmatiker (AA). Stimuli: G, deutsches Staubextrakt. Fi, finnisches Staubextrakt. Ch, chinesisches Staubextrakt. Am, amisches Staubextrakt. FC; fold change. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Phänotyp	Zytokin	Stimulus	mittlere Genexpressionsänderung (FC)	p-Wert	n
alle	IL-1β	G	6.56	<0.0001 ***	42
AA	IL-1β	G	6.95	<0.0001 ***	18
GK	IL-1β	G	6.26	<0.0001 ***	24
alle	IL-1β	Fi	7.20	<0.0001 ***	42
AA	IL-1β	Fi	7.89	<0.0001 ***	18
GK	IL-1β	Fi	6.68	<0.0001 ***	24
alle	IL-1β	Am	6.47	<0.0001 ***	42
AA	IL-1β	Am	7.33	<0.0001 ***	18
GK	IL-1β	Am	5.83	<0.0001 ***	24
alle	IL-1β	LPS	5.99	<0.0001 ***	42
AA	IL-1β	LPS	6.65	<0.0001 ***	18
GK	IL-1β	LPS	5.50	<0.0001 ***	24

alle	IL-18	G	1.11	0.003 **	19
AA	IL-18	G	1.76	0.01 *	8
GK	IL-18	G	0.65	0.1 ns	11
alle	IL-18	Fi	2.20	0.0004 ***	19
AA	IL-18	Fi	3.38	0.03 *	7
GK	IL-18	Fi	1.51	0.0003 ***	12
alle	IL-18	Am	1.83	<0.0001 ***	18
AA	IL-18	Am	2.49	0.003 **	7
GK	IL-18	Am	1.42	0.001 **	11
alle	IL-18	LPS	1.20	0.01 *	17
AA	IL-18	LPS	1.93	0.005 **	7
GK	IL-18	LPS	0.69	0.3 ns	10
alle	IL-1 α	G	5.10	<0.0001 ***	38
AA	IL-1 α	G	5.88	<0.0001 ***	16
GK	IL-1 α	G	4.53	<0.0001 ***	22
alle	IL-1 α	Fi	5.91	<0.0001 ***	40
AA	IL-1 α	Fi	7.18	<0.0001 ***	17
GK	IL-1 α	Fi	4.98	<0.0001 ***	23
alle	IL-1 α	Am	5.93	<0.0001 ***	40
AA	IL-1 α	Am	7.44	<0.0001 ***	17
GK	IL-1 α	Am	4.82	<0.0001 ***	23
alle	IL-1 α	LPS	4.63	<0.0001 ***	36
AA	IL-1 α	LPS	5.99	<0.0001 ***	17
GK	IL-1 α	LPS	3.41	<0.0001 ***	19
alle	TNF- α	G	5.93	<0.0001 ***	35
AA	TNF- α	G	5.17	<0.0001 ***	16
GK	TNF- α	G	6.57	<0.0001 ***	19
alle	TNF- α	Fi	6.93	<0.0001 ***	38
AA	TNF- α	Fi	7.46	<0.0001 ***	18
GK	TNF- α	Fi	6.44	<0.0001 ***	20
alle	TNF- α	Am	6.31	<0.0001 ***	38
AA	TNF- α	Am	6.95	<0.0001 ***	18
GK	TNF- α	Am	5.72	<0.0001 ***	20
alle	TNF- α	LPS	6.23	<0.0001 ***	37
AA	TNF- α	LPS	6.56	<0.0001 ***	18
GK	TNF- α	LPS	5.91	<0.0001 ***	19
alle	IL-5	G	1.20	0.0003 ***	43

AA	IL-5	G	2.02	<0.0001 ***	19
GK	IL-5	G	0.54	0.2 ns	24
alle	IL-5	Fi	1.01	0.001 **	42
AA	IL-5	Fi	1.56	0.0002 ***	19
GK	IL-5	Fi	0.56	0.2 ns	23
alle	IL-5	Am	0.34	0.5 ns	43
AA	IL-5	Am	1.05	0.03 *	19
GK	IL-5	Am	-0.23	0.5 ns	24
alle	IL-5	LPS	0.58	0.04 *	43
AA	IL-5	LPS	0.77	0.06 ns	19
GK	IL-5	LPS	0.42	0.2 ns	24
alle	IFN- γ	G	1.44	0.0005 ***	42
AA	IFN- γ	G	1.40	0.008 **	19
GK	IFN- γ	G	1.48	0.02*	23
alle	IFN- γ	Fi	2.36	<0.0001 ***	41
AA	IFN- γ	Fi	2.61	0.0003 ***	18
GK	IFN- γ	Fi	2.16	0.0002 ***	23
alle	IFN- γ	Am	1.68	<0.0001 ***	40
AA	IFN- γ	Am	1.98	0.0007 ***	19
GK	IFN- γ	Am	1.40	0.03 *	21
alle	IFN- γ	LPS	1.40	<0.0001 ***	41
AA	IFN- γ	LPS	1.31	0.04 *	19
GK	IFN- γ	LPS	1.48	<0.0001 ***	22

Tabelle 20: Änderung der Zytokinkonzentration auf Stimulation mit Staubextrakten. alle, gesamte Studienkohorte. AA, allergische Asthmatiker. GK, gesunde Kontrollen. Mittelwert, mittlere Änderung in Log₂ pg/ml. p-Wert mittels test ob log₂ des fold-change gleich Null. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

9.2 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
µm	mikrometer
AA	allergische Asthmatiker
AK	Antikörper
allg.	allgemein
ASC	engl. <i>apoptosis-Associated speck-Like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveolären Lavage
BMI	engl. <i>Body-mass-index</i>
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CASP 1	Caspase 1
Casp 4	Caspase 4
CASP1	Caspase 1
cDNA	komplementäre DNS, engl. <i>complementary DNA</i>
Clara	<i>CLinical Asthma Research Association</i>
CT	engl. <i>threshold cycle</i>
DAMPs	Gefahr-assoziiert molekulare Partikel, engl. <i>danger-associated molecular patterns</i>
EDC	Elektrostatische Staub Kollektoren engl. <i>electrostatic dust collector</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
engl.	englisch
FC	engl. fold change
FEV ₁	forcierte Einsekundenkapazität
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GK	gesunde Kontrollen
HDM	Hausstaubmilben-induziertem
IgE	Immunglobulin E
IL-10	Interleukin 10
IL-18	Interleukin 18
IL-1β	Interleukin 1β
IL-1α	Interleukin 1α
IL-2	Interleukin 23
IL-23	Interleukin 23

IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
INF- γ	Interferon γ
IQR	Interquartils Abstand
IQR	Interquartilen Abstand
IU	engl. <i>internationale Units</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Medium
MHC	major histocompatibility complex
mL	Milliliter
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
ns	nicht signifikant
NTC	Negativkontrolle, engl. <i>Non template control</i>
OVA	Ovalbumin-induziertem Asthma bronchiale Mausmodell
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Partikel
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes , engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion, engl. <i>polymerase chain reaktion</i>
PEF	Spitzenfluss, engl. Peak flow
PYD	Pyrin-Domäne
qPCR	quantitativen real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure engl. <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
SEM	
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus, engl. <i>Single-Nucleotid-Polymorphismus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF- α	Tumor-nekrose Faktor α

Treg	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
VC	Vitalkapazität
χ^2 -Test	Chi-Quadrat-Test

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Proteasom und das Inflammasom im Vergleich [47]. Durch Stimulation mit INF- γ werden die katalytischen Einheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ durch die katalytischen Einheiten des Immunoproteasoms $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) ersetzt.	11
Abbildung 2: Signalweg des Inflammasoms. Verschiedene Einflüsse, die zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen und somit zur IL-1 β und IL-18 Synthese [61].	13
Abbildung 3: Pipettierschemata der <i>qRT-PCR</i> Platte. Horizontal wird die Patientenprobe aufgetragen. Vertikal die verschiedenen Primer. <i>NTC</i> , Negativkontrolle ohne cDNA.	26
Abbildung 4: <i>Cycler</i> -Protokoll <i>iCycler</i>	27
Abbildung 5: Fluoreszenzdetektion in Abhängigkeit der Zyklen.	28
Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse. Links: spezifische Primer und dadurch nur ein Schmelzpunkt. Rechts: Verunreinigung und dadurch zweigipflige Schmelzkurve.	29
Abbildung 7: Darstellung der Studienkohorte mit Ausschlüssen. n, Anzahl der Fälle. AA, Allergische Asthmatiker. GK, gesunde Kontrollen.	31
Abbildung 8: Überblick über die auf <i>18S</i> normalisierten Genexpressionen aller gemessenen Gene und aller Stimulationsbedingungen. Gemessen in <i>PBMCs</i> aller Studienpatienten (AA und GK, n = 46), mittels <i>RTq-PCR</i> . Boxplots zeigen Median und Interquartilen Abstand (IQR) der ΔCT -Werte. Die Endpunkte der Boxplots zeigen Min und Max.	38
Abbildung 9: Genexpression der Marker des Immunoproteasoms und Proteasoms, unstimuliert. Vergleich AA und GK. Gemessen in <i>PBMCs</i> . Normalisierte Genexpression auf <i>18S</i> . Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	39
Abbildung 10: A-F: Genexpression der Marker des Immunoproteasoms und Proteasoms nach Stimulation. Gemessen in <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen und allergischer	

Asthmatiker. A: Stimulation mit einem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (G). B: Stimulation mit einem auf einem finnischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Fi). C: Stimulation mit einem auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Ch). D: Stimulation mit einem bei den Amischen gewonnenen Staubextrakt (Am). E; Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), F: Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörper. *FC*; *fold change*. Balkendiagramme, Mittelwert mit SEM. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 41

Abbildung 11: Genexpression der Marker des Inflammasoms, unstimuliert. Gemessen in *PBMCs* von gesunden Kontrollen (GK) und allergischen Asthmaticern (AA). Normalisierte Genexpression auf *I8S*. Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. statistische Analyse mittels T-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 44

Abbildung 12: A-F: Genexpression der Marker des Inflammasoms nach Stimulation in *PBMCs* von gesunden Kontrollen (GK) und allergischen Asthmaticern (AA). A: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G). B: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen auf einem finnischen Bauernhof (Fi). C: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen auf einem chinesischen Bauernhof (Ch). D: Stimulation durch ein Staubextrakt gewonnen bei den Amischen (Am). E: Stimulation durch LPS, F: Stimulation durch anti-CD3/CD28-Antikörper. *FC*; *fold change*. Balkendiagramme, Mittelwert mit SEM. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 49

Abbildung 13: Genexpression der *Interleukine 1 β* , *18* und *1 α* . AA und GK im Vergleich vor und nach Stimulation mit Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Normalisierte Genexpression auf *I8S*. Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. Statistische Analyse mittels t-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 50

Abbildung 14: Überblick über die Zytokinkonzentration aller gemessener Zytokine und aller Stimulationsbedingungen sowie unstimuliert in pg/ml. Gemessen im Überstand von *PBMCs* aller Studienpatienten (AA und GK, n = 43), mittels Luminex-Technologie. Boxplots zeigen Median und IQR. Endpunkte der Boxplots zeigen Min und Max..... 53

Abbildung 15: Zytokinkonzentrationen ($\log_2(\text{pg/ml})$), unstimuliert. Gemessen im Überstand von <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen (GK) und allergischer Asthmatiker (AA). Fallzahl variiert je nach Zytokin. GK/AA; IL-1 β (22/17); IL-18 (13/10); IL-1 α (20/17); TNF- α (20/15); INF- γ (20/13); IL-5 (7/3). Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. statistische Analyse mittels Wilcoxon-Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	55
Abbildung 16: Korrelation der Genexpression (ΔCT) und Zytokinkonzentration ($\log_2(\text{pg/ml})$) von IL-1 β . A; gesamte Kohorte. B; gesunde Kontrollen. C; allergische Asthmatiker. r , Korrelationskoeffizient nach Pearson.	55
Abbildung 17: Korrelation der Genexpression und Zytokinkonzentration ($\log_2(\text{pg/ml})$) von IL-18. A; gesamte Kohorte. B; gesunde Kontrollen. C; allergische Asthmatiker. r , Korrelationskoeffizient nach Pearson.....	56
Abbildung 18: Korrelation der Genexpression und Zytokinkonzentration ($\log_2(\text{pg/ml})$) von IL-1 α . A; gesamte Kohorte. B; gesunde Kontrollen. C; allergische Asthmatiker. r , Korrelationskoeffizient nach Pearson.....	57
Abbildung 19: A-D: Zytokinsekretion nach Stimulation. Gemessen im Überstand <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. A: Stimulation mit einem auf einem deutschen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (G). B: Stimulation mit einem auf einem finnischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Fi). C: Stimulation mit einem auf einem chinesischen Bauernhof gewonnenen Staubextrakt (Ch). D: Stimulation mit einem bei den Amischen gewonnenen Staubextrakt (Am). E; Stimulation mit LPS, F: Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörper. <i>FC</i> ; <i>fold change</i> . Balkendiagramme, Mittelwert mit SEM. Statistische Analyse mittels T-Test. Dargestellt wird die Änderung der Sekretion durch die Stimulation der Stäube sowie der Vergleich zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen durch Klammern, r . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	58
Abbildung 20: Zytokinsekretion der Interleukine 1 β , 18 und 1 α . Allergische Asthmatiker und gesunde Kontrollen im Vergleich vor und nach Stimulation mit den Staubextrakten, gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Boxplots mit ICQ. Fehlerbalken enthalten 10-90 Perzentile. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Test ob signifikanter Unterschied zwischen Zytokinsekretion von <i>PBMCs</i>	

von allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 60

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien der Studienkohorte..... 24

Tabelle 2: Klinische Daten aller eingeschlossenen Studienpatienten mit vollständigen Angaben. Vergleich allergischer Asthmatiker (AA) und gesunder Kontrollen (GK). n, Anzahl der Fälle. Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten als Prozentsatz der Leukozyten angegeben. IU, internationale Einheiten. Angegeben sind Median und Interquartils Abstand (IQR). Abweichende Anzahl an Fällen aufgrund fehlender Angaben auf den Fragebögen möglich. * $p < 0.05$. Statistische Testung mittels Mann-Whitney-U-Test oder χ^2 -Test (†)..... 32

Tabelle 3: Sozioökonomische Daten über Fragebogen erhoben. Vergleich AA und GK. Prozente wurden als angepasste Prozente angegeben, nicht beantwortete Fragen oder mit "weiß nicht" beantwortete Fragen wurden ausgeschlossen. * $p < 0.05$. statistische Testung mittels χ^2 -Test nach Pearson oder Mann-Whitney-U-Test (†) 34

Tabelle 4: Deskriptive Statistik der Spirometer Untersuchung der allergischen Asthmatiker, n=20 (n=1, fehlende Angaben). Sollwerte altersabhängig, "Mittelwert Prozent von Soll" bezieht sich auf den Mittelwert der Prozente vom jeweils altersentsprechendem Sollwert. 35

Tabelle 5: Ausschlüsse aufgrund mangelhafter Qualität der Messungen. n, Anzahl der Fälle. Stimulation durch Staubextrakte, gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). LPS, Lipopolysaccharid. M, Medium, kein Stimulus zugesetzt..... 37

Tabelle 6: Änderung der Genexpression der Marker des Immunoproteasoms und Proteasoms durch Stimulation. Gemessen in *PBMCs* gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation durch Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). *FC*; *fold change*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Darstellung nur signifikanter Änderungen, vollständige Darstellung siehe Anhang Tabelle 17) 42

Tabelle 7: Vergleich der Änderung der Genexpression (FC logSkala) durch die Staubextrakte. Stimulation durch Staubextrakte, gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Kohorte gesamt, n=46. Statistische Testung mittels t-Test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.	43
Tabelle 8: Änderung der Genexpression des <i>NLRP3</i> Inflammasoms durch Stimulation. Gemessen in <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). <i>FC</i> ; <i>fold change</i> . *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.	45
Tabelle 9: Änderung der Genexpression von <i>CASP1</i> und <i>CASP4</i> durch Stimulation. Gemessen in <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatiker. Stimulation mit Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). <i>FC</i> ; <i>fold change</i> . *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Darstellung nur signifikanter Änderungen und Phänotyp "alle", weitere Werte siehe Tabelle 18 im Anhang.	46
Tabelle 10: Änderung der Genexpression <i>IL-1β</i> , <i>IL-18</i> und <i>IL-1α</i> durch Stimulation im Vergleich AA und GK. Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). <i>FC</i> ; <i>fold change</i> . *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.	48
Tabelle 11: Vergleich der Änderung der Genexpression (<i>FC</i>) durch die Staubextrakte, Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). Kohorte gesamt, n=46. statistische Testung mittels t-Test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.	52
Tabelle 12: Ausschlüsse der Zytokinmessungen, n=43. Stimulation durch Staubextrakte gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischen Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am).	52

Tabelle 13: Überblick über die Zytokinkonzentrationen aller gemessener Zytokine. Minimum und Maximum. Range zwischen maximalem und minimalem Wert. Angabe in pg/ml.....	53
Tabelle 14: Übersicht über die Änderung der Genexpression des Immunoproteasoms nach Stimulation mit den Staubextrakten, gesammelt auf einem deutschen (G), einem finnischen (Fi), einem chinesischem (Ch) Bauernhof und bei den Amischen (Am). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	62
Tabelle 15: Übersicht über die Änderung der Genexpression und Zytokinsekretion des Inflammasoms nach Stimulation mit den Staubextrakten, gesammelt auf einem deutschen (G), einem finnischen (Fi), einem chinesischem (Ch) Bauernhof und bei den Amischen (Am). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	63
Tabelle 16: Unterschiede in der Genexpression und der Zytokinsekretion zwischen allergischen Asthmatikern und gesunden Kontrollen ohne Stimulation und nach Stimulation mit Staubextrakten, gesammelt auf einem deutschen (G), einem finnischen (Fi), einem chinesischem (Ch) und bei den Amischen (Am). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ↓, weniger Genexpression der dargestellten Gruppe.	64
Tabelle 17: Änderung der Genexpression des Immunoproteasoms und Proteasoms durch Stimulation. Gemessen in <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatischer. Stimulation durch Staubextrakten gewonnen auf einem deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischem Bauernhof (Ch) und bei den Amischen (Am). <i>FC</i> ; <i>fold change</i> . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	100
Tabelle 18: Änderung der Genexpression von CASP1 und CASP4 durch Stimulation. Gemessen in <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen und allergischer Asthmatischer. Stimulation mit Staubextrakten gewonnen auf einem Änderung deutschen Bauernhof (G), einem finnischen Bauernhof (Fi), einem chinesischem Bauernhof (Ch) und einem amischen Bauernhof bei den Amischen(Am). <i>FC</i> ; <i>fold change</i> . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	101
Tabelle 19: Änderung der Genexpression von IL-1 β , IL-18 und IL-1 α durch Stimulation. Gemessen in <i>PBMCs</i> gesunder Kontrollen (GK) und allergischer Asthmatischer (AA). Stimuli: G, deutsches Staubextrakt. Fi, finnisches Staubextrakt. Ch,	

chinesisches Staubextrakt. Am, amisches Staubextrakt. *FC*; *fold change*. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. 104

Tabelle 20: Änderung der Zytokinkonzentration auf Stimulation mit Staubextrakten. alle, gesamte Studienkohorte. AA, allergische Asthmatiker. GK, gesunde Kontrollen. Mittelwert, mittlere Änderung in Log2 pg/ml. p-Wert mittels test ob log2 des fold-change gleich Null. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001..... 106

9.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

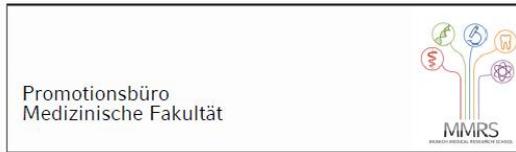
Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Bianca Schaub für die ausgezeichnete Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, besonders gilt hier mein Dank Andreas Böck, der mich bei der Durchführung der statistischen Auswertung unterstützt hat.

Außerdem möchte ich mich beim Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFole) der LMU bedanken, durch dessen organisatorische und finanzielle Förderung dieses Projekt ermöglicht wurde.

Des Weiteren möchte ich zudem der AG Meiners und dem Cancer Vaccine Lab um Prof. Schnurr meinen Dank äußern, die meine Arbeit durch ihre Unterstützung und interessanten Austausch positiv beeinflusst hat.

Meiner Familie, meinen Freunden und vor allem meinem Großvater Franz-Josef Nicklas danke ich für ihre Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

9.6 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Tatjana Beutenmüller
(Name, Vorname)

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die Bedeutung des Immunoproteasoms und Inflammasoms bei Asthma bronchiale im Kindesalter- Studien zum „Bauernhofeffekt“ im weltweiten Vergleich

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ludwigsburg, 03.02.2022

Ort, Datum

Tatjana Beutenmüller

Unterschrift Doktorandin