Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

Einfluss von Biologika-Therapien auf B-Zell-Subpopulationen von Patienten mit schwerem Asthma

Eine klinisch–experimentelle Studie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)
vorgelegt der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

von
Marieke Dost aus Bremen

Rostock, Mai 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004652

Dekan: Herr Prof. Dr. med. univ. Emil C. REISINGER

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch
   Universitätsmedizin Rostock
   Pneumologie

2. Herr Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz
   Universitätsmedizin Rostock
   Klinische Pharmakologie und Toxikologie

3. Herr Prof. Dr. med. Christian Taube
   Universitätsmedizin Essen, Ruhrlandklinik
   Pneumologie

Verteidigungstermin: 13.03.2024

MEINEN ELTERN GEWIDMET.

Anmerkung

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit die männliche Form verwendet. Das gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf alle Geschlechteridentitäten.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Epidemiologie und Definition von Asthma 1

1.2 Asthma Formen 1
1.2.1 „Early-onset Asthma“ vs. „Adult-onset Asthma” 1
1.2.2 Allergisches Asthma vs. nicht-allergisches Asthma 2
1.2.3 „Type-2-High-Asthma“ vs. „Type-2-Low-Asthma” 2

1.3 Asthma-Kontrolle 3

1.4 Generelle Therapiestrategien und Asthma-Schweregrade 4

1.5 Pathophysiologie 9

1.6 Zugelassene systemische immunmodulatorische Therapien 13
1.6.1 AIT 13
1.6.2 Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten 14
1.6.3 Biologika 14

1.7 B-Zellen 18
1.7.1 Entwicklung 18
1.7.2 Regulatorische B-Zellen (Bregs) 21
1.7.3 Rolle von Bregs in Krankheiten 22

1.8 Fragestellung 23

2 MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 Studiendesign 24
2.1.1 Rekrutierung von Patienten und Probanden 24
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien 24
2.1.3 Ablauf der Studie 25
2.1.4 Votum der Ethikkommission 26

2.2 Bodyplethysmographie 26

2.3 FeNO-Wert-Messung 29

2.4 Blutentnahme 30

2.5 Messungen im Zentrallabor 31

2.6 Durchflusszytometrie 31

2.7 Gesamt-IgE-Messung 36

2.8 Fragebögen 36
2.8.1 ACT 37
2.8.2 ACQ6 37
2.8.3 SGRQ 37

2.9 Statistische Auswertung 38

3 ERGEBNISSE 39

3.1 Patientencharakteristika bei Studieneinschluss 39

3.2 Lungenfunktion und Asthma-Kontrolle 40

3.3 Biomarker 40
3.3.1 FeNO 41
3.3.2 Eosinophile Granulozyten 41
3.3.3 Gesamt-Immunglobulin E 41

3.4 Anzahl der B-Zellen und TB-Zellen ($CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$) im Blut 44
3.4.1 Gesamt-B-Zellzahlen 44
3.4.2 Transitionale B-Zellen (TB-Zellen) 44

3.5 Weitere B-Zell-Populationen im peripheren Blut 47
3.5.1 $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen 47
3.5.2 Naive B-Zellen 47
3.5.3 Non-Switched Memory B-Zellen 47
3.5.4 Switched Memory B-Zellen 48
3.5.5 Plasmablasten 48

4 DISKUSSION 51

4.1 Methodologische Stärken der Studie 53
4.1.1 Elaborierte Analyse der B-Zellen mittels moderner Durchflusszytometrie 53
4.1.2 Untersuchung von Patienten mit schwerem Asthma im realen Leben 54
4.1.3 Präzise Charakterisierung der Patientengruppen 54

4.2 Methodologische Schwächen der Studie 55
4.2.1 Unterschiedliche Patientenpopulationen in der Dupilumab- und Benralizumab-Gruppe 55
4.2.2 Niedrige Fallzahlen in der Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe 56
4.2.3 Fehlende funktionelle Charakterisierung der TB-Zellen 56
4.2.4 Fehlende Erfassung der potentiell veränderten Begleittherapie unter Benralizumab- und Dupilumab-Therapie 57

4.3 Hypothesen 57
4.3.1 Dupilumab-Therapie erhöht die TB-Zellpopulation und senkt somit die IgE-Produktion bei Patienten mit schwerem Asthma 57
4.3.2 Prädiktoren für ein gutes Therapieansprechen auf Dupilumab bei Patienten mit schwerem Asthma 58
4.3.3 Benralizumab-Therapie führt zu keiner Veränderung der TB-Zellpopulation 59

5 ZUSAMMENFASSUNG 60

6 LITERATURVERZEICHNIS 61

7 ANHANG 66

7.1 Abkürzungsverzeichnis 66

7.2 Abbildungsverzeichnis 68

7.3 Tabellenverzeichnis 69

7.4 Publikationen 70

7.5 Curriculum Vitae 71

7.6 Danksagung 73

7.7 Eidesstattliche Erklärung 74

8 THESEN 76

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Definition von Asthma

Asthma ist als eine heterogene Erkrankung definiert, welche durch eine chronische Atemwegsentzündung mit bronchialer Hyperreagibilität sowie einer variablen Atemwegsobstruktion imponiert [1]. Weltweit sind circa 300 Millionen Menschen von einer Asthmaerkrankung betroffen [2]. Nach einem kontinuierlichen Anstieg im vergangenen Jahrhundert, stagniert die Prävalenz zur Zeit bei diesem Wert [3]. In Deutschland sind nach der Querschnittstudie „Gesundheit in Deutschland aktuell (GEDA) 2014/2015-EHIS“ laut Selbstangaben deutscher Erwachsener 6,2% von einer Asthmaerkrankung betroffen. In Deutschland sind Frauen häufiger betroffen als Männer und Kinder sind mit 4% weniger stark betroffen als Erwachsene [4]. Bei Asthma weisen die Patienten typische, wiederkehrende respiratorische Symptome wie ein anfallsartiges Auftreten von Atemnot, pfeifende Atemgeräusche („Giemen“), Engegefühl in der Brust sowie Husten mit oder ohne Auswurf auf. Diese Symptome dominieren nachts und in den frühen Morgenstunden [1,4]. Die genannten Symptome zeigen eine Varianz in Häufigkeit und Ausprägung und können somit sowohl Wochen bis Monate spontan (oder auf Medikamentengabe hin) sistieren, als auch episodisch wieder auftreten. Wiederkehrende Symptome können zu starken Anfällen führen, welche als Exazerbationen bezeichnet werden. Sie können lebensgefährlich für den Patienten sein. Gewisse Trigger-Faktoren wie körperliche Belastung, Allergenexposition, Wetterumschläge oder virale respiratorische Infektionen können solche episodischen Verschlechterungen auslösen[1].

1.2 Asthma Formen

1.2.1 „Early-onset Asthma“ vs. „Adult-onset Asthma”

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Asthmaerkrankung einzuordnen. Ein mögliches Einordnungskriterium stellt das Manifestationsalter der Erkrankung dar. Hier ist zwischen dem „Early-onset Asthma“ und dem „Adult-onset Asthma“ zu unterscheiden. Ersteres manifestiert sich bereits häufig im Kindesalter („Early-onset“) [5].

Diese Asthmaform steht gehäuft in Verbindung mit Allergien [5]. Außerdem besteht eine Vergesellschaftung mit Krankheiten des atopischen Formenkreises wie atopischer Dermatitis und Rhinitis [6,7]. Das „Adult-onset Asthma“ tritt hingegen erstmalig im Erwachsenenalter auf und hat meist keinen Bezug zu Allergien, kann aber ebenfalls mit einer chronischen Rhinosinusitis sowie Nasenpolypen vergesellschaftet sein [5].

1.2.2 Allergisches Asthma vs. nicht-allergisches Asthma

Weiterhin kann bei einer Asthmaerkrankung eine Einteilung in das allergische und das nicht-allergische Asthma vorgenommen werden. Das allergische Asthma steht in Verbindung mit Allergien und wird auch als extrinsisches Asthma bezeichnet. Umweltfaktoren wie Hausstaubmilben, Schimmelpilze oder auch verschiedenste Gräser- und Baumpollen können als Allergene eine akute Verschlechterung der Asthmasymptome hervorrufen, welche dementsprechend saisonal variieren können [6,7]. Zusätzlich manifestiert sich das allergische Asthma bereits meistens im Kindes- und Jugendalter [8]. Das nicht-allergische Asthma wird auch als intrinsisches Asthma bezeichnet. Hier erkranken die Patienten erst später im Leben verglichen mit dem Manifestationsalter beim allergischen Asthma. Zusätzlich ist das weibliche Geschlecht häufiger betroffen. Das nicht-allergische Asthma ist mit Nasenpolypen, einer Aspirin-Sensibilisierung, sowie einer Steroid-Abhängigkeit vergesellschaftet. Es besteht weder eine Verbindung zu Allergien, noch ist das Immunglobulin E (IgE)-Serum Level, wie bei dem allergischen Asthma üblich, erhöht [9].

1.2.3 „Type-2-High-Asthma“ vs. „Type-2-Low-Asthma”

Eine zusätzliche Möglichkeit eine Asthmaerkrankung zu definieren bzw. sie einzuteilen, stellt die Zuordnung in ein „Type-2-High-Asthma“ und „Type-2-Low-Asthma“ dar. In den vorangegangenen Einteilungen wird sich auf den Asthma-Phänotyp der Patienten konzentriert. Hier hingegen werden die Asthma-Endotypen der Patienten, also die pathophysiologischen Mechanismen, welche zu der Erkrankung führen, betrachtet. „Type-2“ nimmt Bezug auf die Typ-2-Zytokine. Dies sind die Interleukine IL-4, IL-5 sowie das IL-13, welche eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen und von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems ausgeschüttet werden [10]. Patienten mit einem „Type-2-High-Asthma“ weisen mindestens einen oder mehrere der folgenden Biomarker auf: Eosinophile

Granulozyten im Blut ≥ 150/µl, FeNO (Fraktion des exhalierten Stickstoffmonoxid) ≥ 20 ppb (ppb steht als Abkürzung für die englische Mengenangabe „parts per billion“, zu deutsch: Teile pro Milliarde), eosinophile Granulozyten im Sputum ≥ 2% und / oder ein Asthma welches klinisch als allergiebezogen imponiert [1] (**s. Abb. 1**). Das „Type-2-Low-Asthma“ definiert sich über eine vorhandene Asthmaerkrankung, bei welcher die Patienten jedoch keine Hinweise auf eine Typ-2-Entzündung aufweisen. Es wird auch als ein nicht-eosinophiles Asthma beschrieben [1,11].

Hinweise auf Vorliegen einer Typ-2-Entzündung
Eosinophile Granulozyten im Blut ≥ 150/µl
und / oder
Stickstoffmonoxid im Exhalat (FeNO) ≥ 20 ppb
und / oder
Eosinophile Granulozyten im Sputum ≥ 2%
und / oder
Klinische Hinweise auf eine allergische Pathogenese (positive Anamnese in Zusammenhang mit Nachweisen einer entsprechenden Sensibilisierung gegen typische Aeroallergene).

Abbildung 1: Hinweise auf Vorliegen einer Typ-2-Entzündung
Biomarker welche auf einen Typ-2-Phänotypen bei Asthma hinweisen. Es muss lediglich mindestens einer dieser Biomarker vorliegen, um den Verdacht auf eine Typ-2-Inflammation äußern zu können. Adaptiert nach [12].

1.3 Asthma-Kontrolle

Eine Asthma-Erkrankung kann anhand des Parameters „Asthma-Kontrolle“ eingeteilt werden. Die Patienten werden in drei Gruppen unterteilt: kontrolliertes Asthma, teilweise kontrolliertes Asthma und unkontrolliertes Asthma. Diese Einteilung sollte in regelmäßigen Abständen (3-Monats-Intervalle) mit vier Fragen kontrolliert werden (**s. Abb. 2**). Zusätzlich kann der Grad der Asthma-Kontrolle durch den „Asthma Control Test“ (ACT-Fragebogen) ermittelt werden [13]. Aus der Asthma-Kontrolle sowie dem eventuellen Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie, ergibt sich der Asthma-

Schweregrad. Dieser legt den Grundstein für die Wahl passender Therapiestrategien [14].

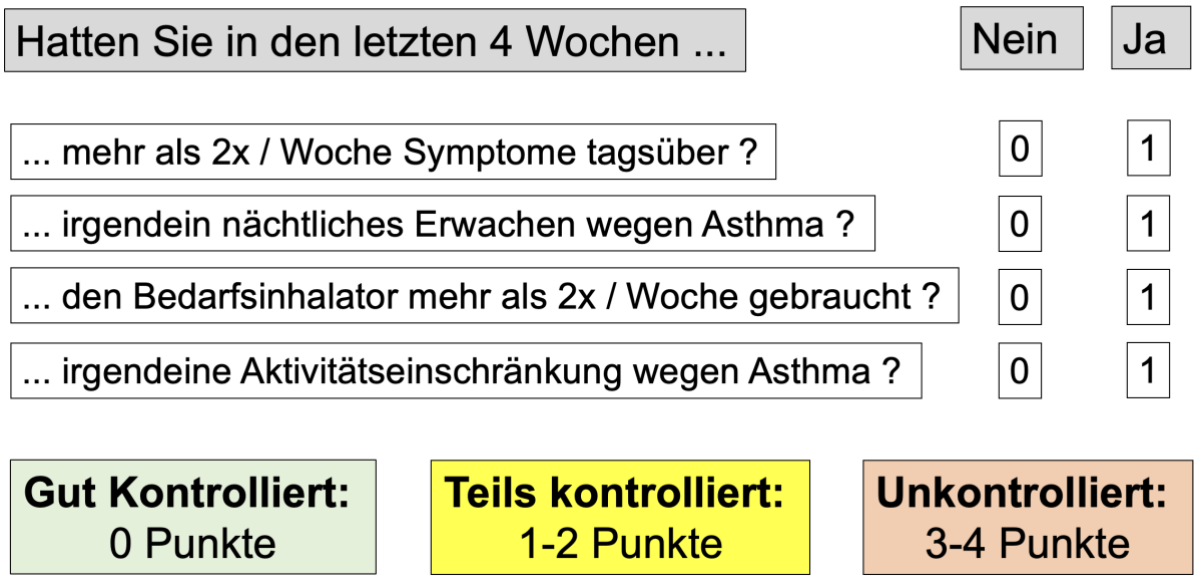


Abbildung 2: Ermittlung der Asthma-Kontrolle mittels vier Fragen der Global Initiative for Asthma (GINA)
Die 4 Fragen beziehen sich auf Symptome des Asthma innerhalb der letzten 4 Wochen und werden vom Patienten mit „Nein“ = 0 Punkte oder „Ja“ = 1 Punkt beantwortet. Es können 0 (gute Kontrolle) bis 4 Punkte (schlechte Kontrolle) erreicht werden. Adaptiert nach [15].

1.4 Generelle Therapiestrategien und Asthma-Schweregrade

In der Asthmatherapie stellt die „Global Initiative for Asthma“ (GINA) verschiedene Therapieziele auf:

- Gute Symptomkontrolle
- Mit Asthma vergesellschaftete Risiken reduzieren (wie Mortalität, Exazerbationen, persistierende reduzierte Lungenfunktion, Nebenwirkungen durch die medikamentöse Therapie) [1]

Ein zusätzliches Ziel des Asthma Managements sollte die Remission darstellen. Im Jahre 2023 definierten Lommatzsch et. al. die Asthma-Remissionskriterien weltweit zum ersten Mal in einer nationalen (Sk2-)Leitlinie wie folgt: keine vorhandenen Asthmasymptome für mindestens 12 Monate, keine Asthma Exazerbationen für mindestens 12 Monate, eine stabile Lungenfunktion sowie keine vorhandene Indikation einer systemischen Kortikosteroid-Gabe aufgrund eines Asthma (**s. Tab. 1**) [12]. Sofern diese Kriterien erfüllt seien, sei eine Asthma-Remission vorhanden, selbst

wenn die Remission nur für die Zeit der medikamentösen Behandlung anhielte [16]. Außerdem sollte stets auf die individuellen Patientenziele sowie -wünsche für die Asthmatherapie geachtet und diese in das Therapiekonzept eingearbeitet werden [1].

Kriterien für eine Asthma-Remission – alle Kriterien müssen erfüllt sein
Dauerhafte (≥ 12 Monate) Abwesenheit von Asthma-Symptomen
Dauerhafte (≥ 12 Monate) Abwesenheit von Exazerbationen
Stabile Lungenfunktion
Kein Bedarf an systemischen Glukokortikoiden für die Behandlung von Asthma

Tabelle 1: Definition der Asthma-Remission
Im Jahre 2023 wurden weltweit erstmals in einer Leitlinie Remission als Ziel der Asthma-Therapie definiert. Die Remissionskriterien bestehen aus 4 Kriterien, welche alle erfüllt sein müssen. Sie beinhalten: Abwesenheit von Asthma-Symptomen, Abwesenheit von Asthma-Exazerbationen, Lungenfunktion sowie kein Bedarf an systemischen Glukokortikoiden aufgrund des Asthma. Adaptiert nach [12].

Um diese Therapieziele zu erreichen, stehen verschiedene Therapieoptionen, sowohl nichtmedikamentöse als auch medikamentöse, zur Verfügung. Insbesondere die medikamentösen Therapieoptionen unterlagen innerhalb den letzten 100 Jahren einem starken Wandel (**s. Abb. 3**).

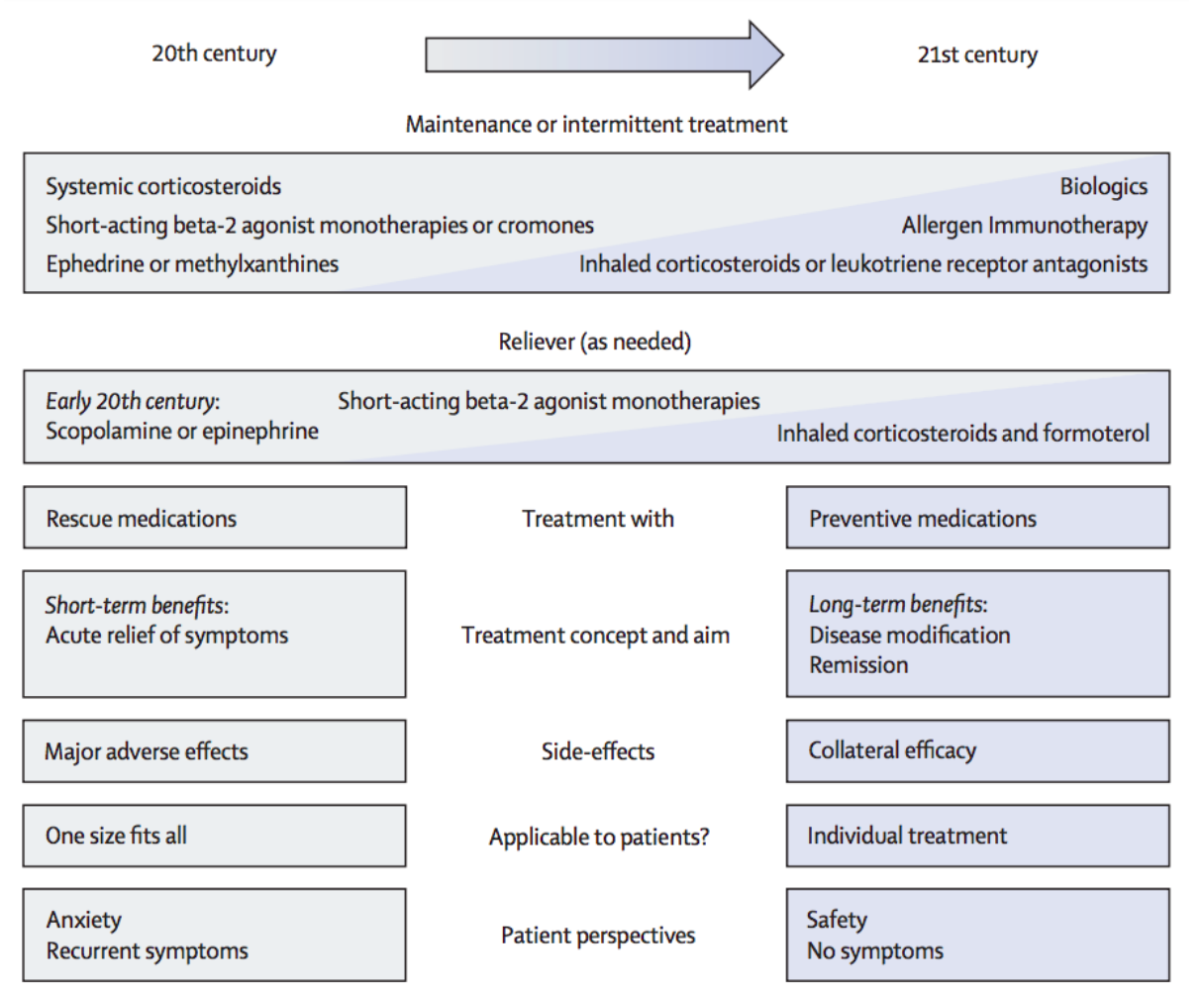


Abbildung 3: Wandel der Asthmatherapie in den letzten 50 Jahren
In den 1970er Jahren bestand die Asthmatherapie aus systemischer Kortikosteroidgabe, kurzwirksamen-Beta-2-Agonisten als Monotherapie sowie Theophyllin. Die Therapie war auf eine akute Beschwerdelinderung der respiratorischen Symptome ausgelegt, bot wenig individuelle Therapieanpassung und hatte multiple gravierende Nebenwirkungen. Aufgrund unzureichender Wirkung und Patientenzufriedenheit, sowie pharmakologischer Weiterentwicklung, verschoben sich die Ziele der Asthma-Therapie hin zu einer auf längerfristige Erfolge ausgelegte Therapie mit präventivem Fokus. Dies wurde durch den Einsatz von Biologika, Allergen-Immuntherapie, inhalativen Kortikosteroiden sowie Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten ermöglicht [16].

Nichtmedikamentöse Maßnahmen

Nichtmedikamentöse Maßnahmen stellen einen Ansatz der Asthmatherapie dar. In der Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma (NVL-Asthma) werden mehrere Maßnahmen empfohlen: Selbsthilfemaßnahmen, Asthma Schulungen, regelmäßiges körperliches Training, Atemphysiotherapie, Rauchentwöhnung sofern der Patient ein Raucher ist bzw. Vermeidung einer Passivrauchexposition, Kontrolle des Körpergewichts, Vermeidung einer Allergen- und Luftschadstoffexposition sowie das Beseitigen eines feuchten Innenraumklimas bzw. Schimmelbefalls [4].

Medikamentöse Maßnahmen

Nach der NVL kann man die medikamentöse Therapie des Asthma in eine 5-Stufen-Therapie gliedern. In diesem Schema sind zusätzlich auch nichtmedikamentöse Ansätze enthalten (**s. Abb. 4**).

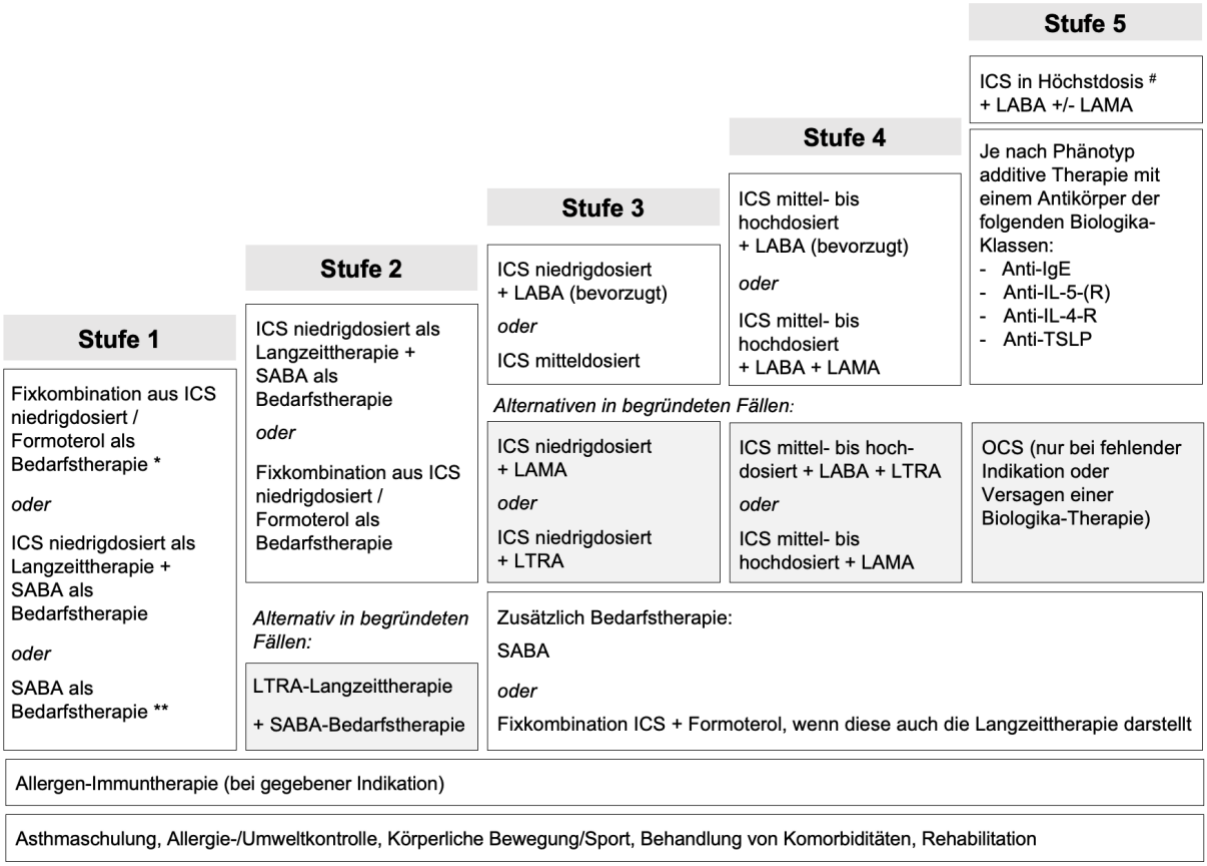


Abbildung 4: Stufenschema der Asthma-Therapie
Medikamentöses Stufenschema der „Sk2-Leitlinie zur fachärztlichen Diagnostik und Therapie von Asthma 2023“: Es werden sowohl die medikamentöse Langzeit-/Bedarfstherapien sowie deren Alternativen für die Asthmastufen 1-5 erläutert, als auch nicht medikamentöse Therapiestrategien genannt. *Abkürzungen:* **ICS** Inhalative Kortikosteroide**, IgE** Immunglobulin E**, IL-5** Interleukin-5, **LABA** Langwirksame Beta-2-Sympathomimetika, **LAMA** Langwirksame Anticholinergika**, LTRA** Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, **OCS** Orale Kortikosteroide, **R** Rezeptor, **SABA** Kurzwirkende Beta-2-Sympathomimetika. ***** Bislang als Bedarfstherapie formal nicht zugelassen, aber seitens der GINA (als präferierte Option) und seitens der NVL Asthma empfohlen. ****** Eine SABA-Bedarfstherapie ist einer ICS/Formoterol-Bedarfstherapie seitens der Prävention von Exazerbation unterlegen. **#** Gemäß ICS-Dosierungstabelle AWMF Online Sk2-Leitlinie [12].

Bei Verdacht auf ein leichtes Asthma sollte die Therapie mit den Stufen 1 und 2 beginnen. Im Falle eines Ansprechens auf diese Therapiestufen im Sinne einer guten Asthma-Kontrolle, ist das Asthma als ein leichtes Asthma einzustufen. Bei einem mittelschweren Asthma sollte die Therapie mit Stufe 3 bzw. 4 begonnen, bzw. auf diese Stufen eskaliert werden, wenn auf den niedrigeren Stufen kein ausreichendes Therapieansprechen erfolgte. Analog wird bei schwerem Asthma die Therapiestufe 5

empfohlen bzw. es muss auf diese eskaliert werden. Die 5. Therapiestufe enthält als Langezeittherapie die Anwendung eines inhalierbaren Kortikosteroids (ICS) in Kombination mit einem langwirksamen Betamimetikum (LABA) sowie einem langwirksamen Anticholinergikum (LAMA). Als Bedarfstherapie werden kurzwirksame inhalative Betamimetika (SABA) oder ICS/Formoterol (LABA) eingesetzt. Hinzu kommen die Biologika. Es werden entweder Anti-IgE-Antikörper, Anti-IL-5-(R)-Antikörper, Anti-IL-4-Antikörper oder Anti-TSLP-Antikörper empfohlen. In begründeten Ausnahmefällen kommen auch orale Kortikosteroide (OCS) zum Einsatz (entweder als Alternative oder additiv). Zusätzlich gibt es ein breites Spektrum an experimentellen immunologischen Therapieansätzen für Patienten mit Asthma [17]. Zusätzlich zu den bereits erwähnten nicht medikamentösen Therapiestrategien (Asthma-Schulungen u.ä.), sollte bei Patienten eine regelmäßige Kontrolle der Inhalationstechnik erfolgen [4,14].

Der Schweregrad einer Asthma-Erkrankung wird anhand des Therapieansprechens sowie der Asthma-Kontrolle (**s. Abb. 2**) als ein entweder leichtes, mittelschweres oder schweres Asthma definiert [14]. Schweres Asthma wird durch die aktuelle Leitlinie der GINA als ein Asthma definiert, bei welchem trotz maximaler inhalativer Therapie keine ausreichende Asthma-Kontrolle erreicht werden kann und andere Ursachen ausgeschlossen werden können (**s. Abb. 5**).

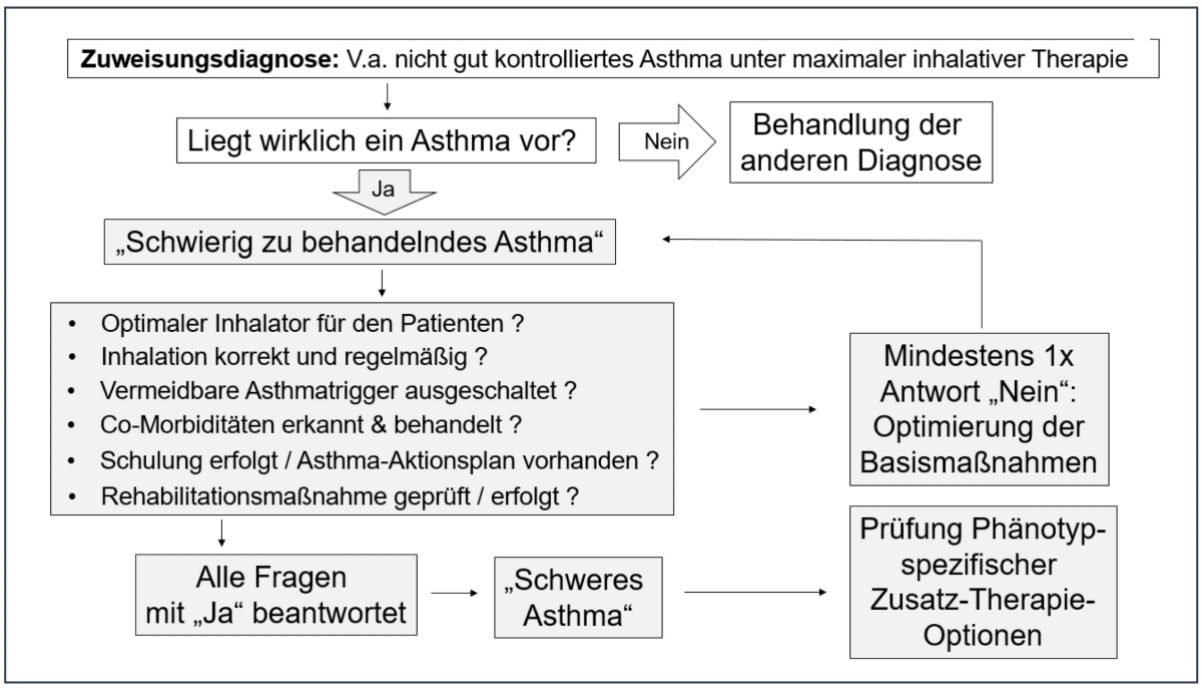


Abbildung 5: Definition „schweres Asthma“ gemäß Leitlinie 2023
Nach Zuweisung eines Patienten mit V.a. ein nicht gut kontrolliertes Asthma unter maximaler inhalativer Therapie, sollte zunächst kontrolliert werden, ob tatsächlich ein Asthma vorliegt. Ist dies der Fall, handelt es sich um ein „schwierig zu behandelndes Asthma“. Es sollte im Anschluss ein Fragenkatalog bearbeitet werden, welcher die inhalative Therapie überprüft, sich mit Ko-Morbiditäten und Asthma-Schulungen usw. beschäftigt. Sofern mindestens eine der 6 Fragen mit „Nein“ beantwortet wird, handelt es sich nach wie vor um ein „schwierig zu behandelndes Asthma“, bei welchem zunächst die Optimierung der Basismaßnahmen angestrebt werden sollte. Sofern alle Fragen mit „Ja“ beantwortet wurden, stellt die Erkrankung ein „schweres Asthma“ dar und es sollte die Prüfung Phänotyp-spezifischer Zusatz-Therapie-Optionen erfolgen. Adaptiert nach [12].

Trotz Einteilungskriterien und eines großen Angebots an Therapiestrategien für Patienten mit Asthma, ist die Therapie eines schweren Asthma nicht immer erfolgreich. Um auch diesen Patienten zukünftig helfen zu können, ist zuerst ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des Asthma notwendig.

1.5 Pathophysiologie

Die Entstehung einer Asthmaerkrankung ist komplex und multifaktoriell bedingt. Unter anderem spielen genetische Disposition sowie Umwelteinflüsse eine Rolle [18]. Auf zellulärer Ebene gibt es ebenfalls verschiedene Ansätze, welche die Pathophysiologie zu erklären versuchen. Sie sollen hier anhand von drei Schlüsselfaktoren, die eine Asthmaerkrankung ausmachen, beschrieben werden: der Atemwegsumbau, die bronchiale Hyperreagibilität sowie die Atemwegsentzündung.

Atemwegsumbau und bronchiale Hyperreagibilität

Bei Asthma kommt es zu einer strukturellen Veränderung der Atemwege, welche zu einer Verdickung der Bronchialwand führt. Diese wird zum einen durch eine Hyperplasie der glatten Muskelzellen, eine Verdickung der subepithelialen Lamina reticularis, vermehrte submuköse Matrix-Ablagerungen, Angiogenese, neuronale Proliferationen sowie eine epitheliale Mukosametaplasie mit vermehrter Schleimproduktion ausgelöst. Zum anderen ist eine Becherzellmetaplasie in den Atemwegen, aufgrund der durch die Atemwegsentzündung eingewanderten Zytokine IL-4, IL-9 und IL-13, an der Verdickung der Bronchialwand beteiligt [19-21] (**s. Abb. 6**). Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der epithelialen Hyperplasie/ Metaplasie und der Schwere des Asthma [20].

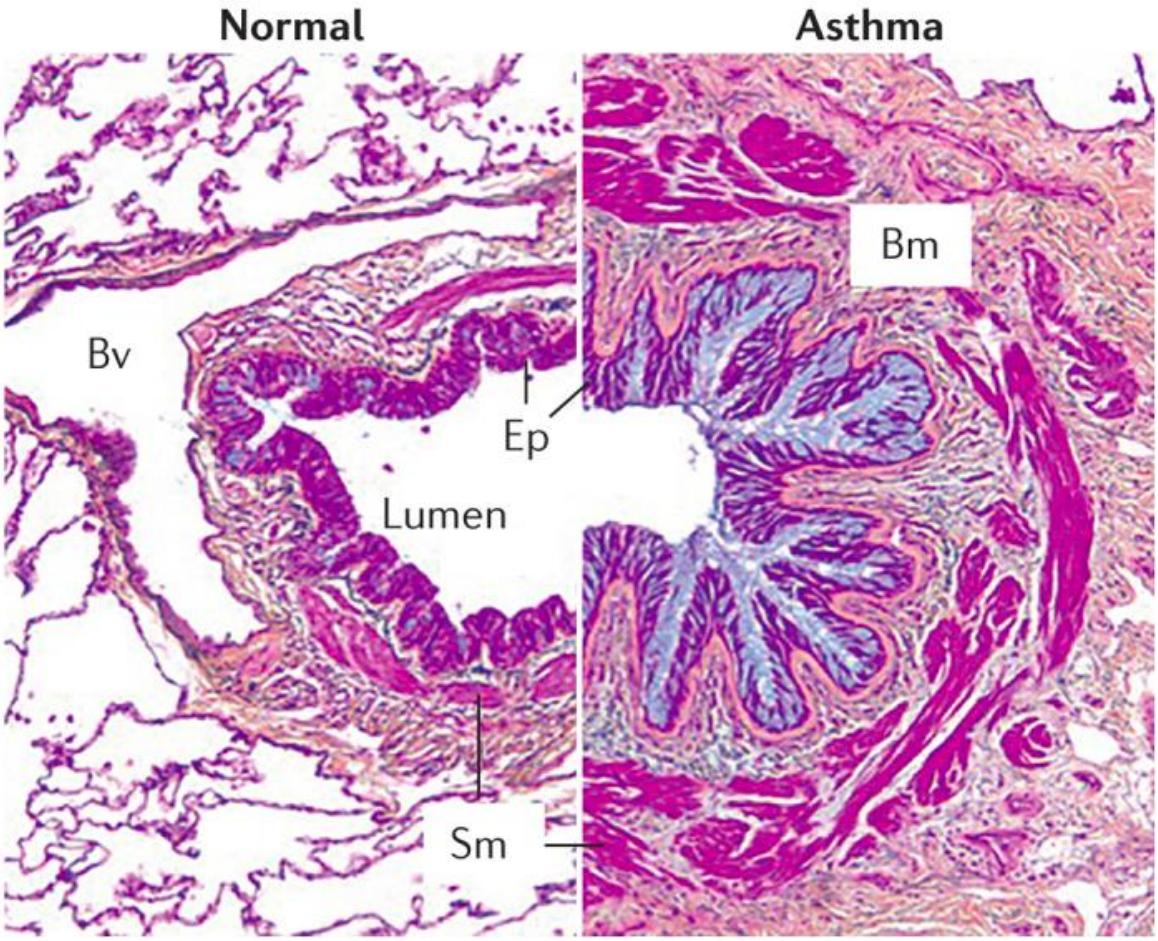


Abbildung 6: Histologische Veränderung der Atemwege bei Asthma im Vergleich zu gesundem Gewebe

Auf der linken Abbildung ist das histologische Bild eines gesunden Atemwegs zu sehen, während auf der rechten Abbildung der Atemweg eines Patienten mit Asthma dargestellt ist. Der Atemweg des Patienten mit Asthma zeigt ein deutlich geringeres Lumen sowie ein deutlich verdicktes Epithel als auch eine verbreiterte Basalmembran im Vergleich zu einem gesunden Atemweg. Dies stellt typische Eigenschaften einer Atemwegsentzündung bei Asthma dar. *Abkürzungen:* **Sm** Smooth muscle (glatte Muskelzellen), **Bm** basement membrane (Basalmembran), **Bv** Blood vessel (Blutgefäß), **Ep** Epithelium (Epithel) [19].

Zusätzlich resultiert der Atemwegsumbau in einer ziliären Dysfunktion. Mögliche Folgen können eine reduzierte Lungenfunktion und eine Atemwegshyperreagibilität sein. Die ziliäre Dysfunktion kann zu einem eingeschränkten Abhusten von Sputum sowie einer Mukusansammlung und somit zu einer (teilweisen) Obstruktion der Atemwege führen. Diese durch eine ziliäre Dysfunktion hervorgerufenen Veränderungen stellen Merkmale eines schweren Asthma dar und können bei einer Asthma-Exazerbation den Tod für die Patienten verursachen [22].

Die Hyperreagibilität des Bronchialsystems basiert auf einer dysfunktionalen bzw. gesteigerten Kontraktion glatter Muskelzellen der Atemwege. Dies ist auf multiple Stimuli, welche durch Atemwegsentzündungen getriggert werden, zurückzuführen [20,23]. Als wichtiger Stimulus zählt hier die Mastzellinfiltration der glatten Muskelzellen der Atemwege. Die Mastzellzahl innerhalb der glatten Muskelzellen der Atemwege ist bei Patienten mit Asthma erhöht. Aufgrund einer Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Prostaglandin D2 (PGD2) und Cysteinyl-Leukotrienen initiieren die Mastzellen eine Kontraktion der Muskulatur. Somit entsteht ein erhöhter bronchialer Muskeltonus, welche in der bronchialen Hyperreagibilität resultiert[24-26].

Atemwegsentzündung

Die Atemwegsentzündung nimmt eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Asthma ein. Sie ist assoziiert mit den Typ-2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13. Diese Zytokine bedingen ein vermehrtes Auftreten inflammatorischer Zellen, wie eosinophile Granulozyten, in den Atemwegen. Sie bewirken eine vermehrte Mukusproduktion, eine durch die Migration von Mastzellen bedingte bronchiale Hyperreagibilität sowie eine gesteigerte IgE-Produktion. Hinzu kommt eine Funktionsstörung struktureller Epithelzellen der Atemwege und eine neuronale Dysfunktion [27,28]. Zudem sezernieren epitheliale Zellen der Atemwege als Reaktion auf eine Allergenexposition eine übermäßige Menge an Mediatoren wie IL-33, IL-25 sowie das Zytokin „Thymic stromal lymphopoietin“ (TSLP). Diese wiederum aktivieren und locken spezifische Immunzellen an. Hierzu gehören T-Helferzellen (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22), dendritische Zellen, B-Zellen sowie die ILC2-Zellen (Typ-2 innate lymphoide Zellen), welche die Sezernierung von Typ-2-Zytokinen anregen. All diese Zellen nehmen eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Entzündung der Atemwege ein [28-30]. Um die Entstehung der Entzündung auf zellulärer Ebene besser verstehen zu können, sind

zwei Signalwege zu betrachten: Der erste beschäftigt sich mit dem adaptiven Immunsystem, der zweite mit dem angeborenen Immunsystem (**s. Abb. 7**).

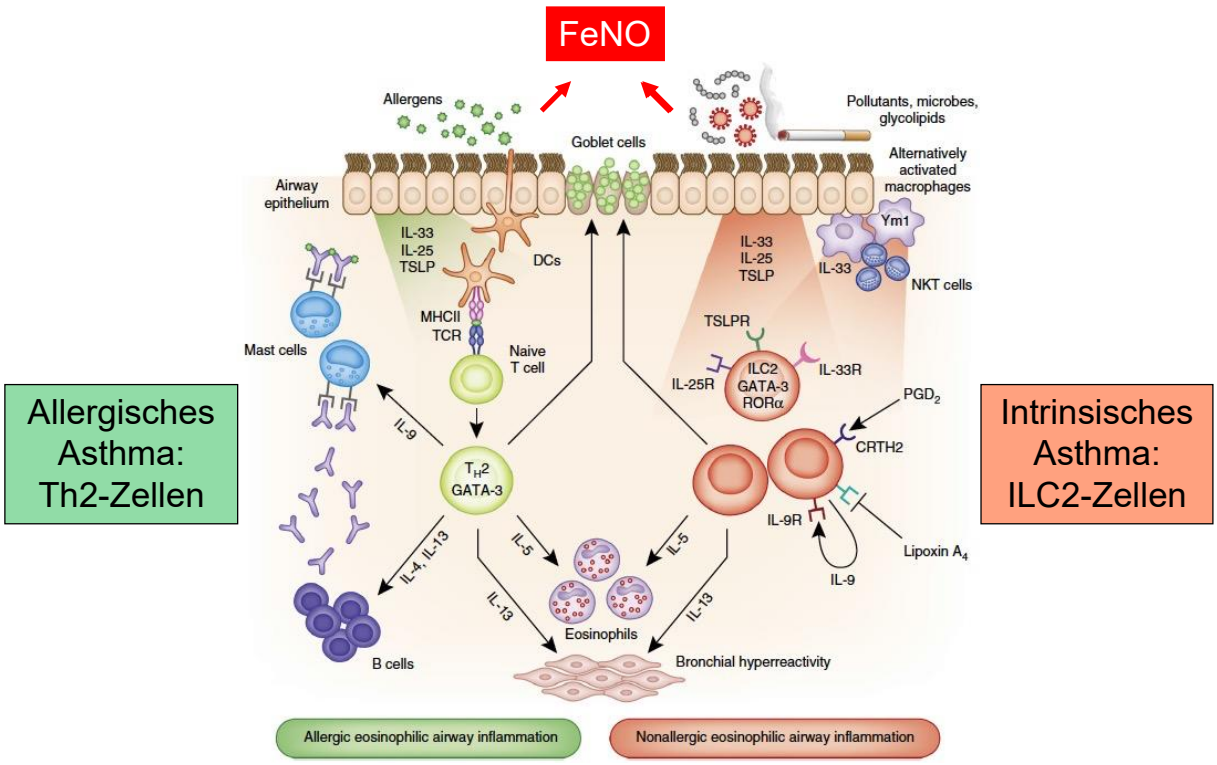


Abbildung 7: **Asthma Immunpathologie: Die Typ-2-Idee**
Es wird ein Erklärungsansatz zweier möglicher Pathomechanismen bei der Asthmaentstehung erläutert: Zum einen via Th2-Helferzellen (assoziiert mit einem allergischen Asthma), zum anderen durch die Aktivierung der ILC2-Zellen, welche die Sezernierung von Typ-2-Zytokinen anregen und mit intrinsischem Asthma in Verbindung stehen. Zusätzlich existieren Mischformen mit Beteiligung beider Wege. Beide Pathomechanismen resultieren unter anderem in einer Eosinophilen- sowie FeNO-Produktion (rot markiert). *Abkürzungen:* **FeNO** Fraction of exhaled nitric oxide (ausgeatmeter Stickstoffwert), **IL** Interleukin, **DC** Dendritische Zellen, **TSLP** Thymic Stromal Lymphopoietin, **Th2** T-Helferzellen Typ 2, **ILC2** Typ-2 innate lymphoide Zellen. Adaptiert nach [27].

Bei dem adaptiven Immunsystem nehmen dendritische Zellen Allergene aus der Umwelt auf und präsentieren diese. Somit stimulieren sie Th2-Helferzellen, welche den Transkriptionsfaktor GATA3 exprimieren. Dieser ist zugehörig zu der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren, welche die Fähigkeit besitzen an die DNA-Sequenz „GATA“ zu binden. GATA3 nimmt eine zentrale Rolle in der weiteren Signalkaskade ein. Er leitet durch Sezernierung der Typ-2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 eine Entzündungsreaktion ein. Über das Zytokin IL-4 können die Th2-Zellen eine allergenspezifische IgE-Synthese stimulieren [17]. Über das IL-5, welches für die Produktion der inflammatorischen eosinophilen Granulozyten im Knochenmark zuständig ist, wird eine erhöhte Konzentration der eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen hervorgerufen und somit zur Entzündungsreaktion beigetragen [27]. Der

zweite Entstehungsweg einer Entzündung führt über das angeborene Immunsystem. Hier agieren die ILC2-Zellen. Sie werden als Antwort auf epitheliale Zytokine (IL-25, IL-33 sowie TSLP) aktiviert. Die ILC2-Zellen sezernieren den Transkriptionsfaktor GATA3, welcher somit in beiden Signalkaskaden von Bedeutung ist. Wie auch bei der Stimulation durch Th2-Helferzellen, produziert GATA3 hier ebenfalls die Typ-2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Hinzu kommt das Typ-2-Zytokin IL-9. Es fördert eine Becherzellmetaplasie und verstärkt das Wachstum und Überleben von Mastzellen. Diese führen zu einer Entzündung und somit zu einem Atemwegsumbau. Zusätzlich unterstützen ILC2-Zellen eine polyklonale IgE-Synthese durch B-Zellen[17]. Der Th2-Weg wird gehäuft mit einem „Early-onset Asthma“ in Verbindung gebracht, während der ILC2-Weg häufiger mit einem „Adult-onset Asthma“ assoziiert wird. Oft sind jedoch Mischformen zu finden, denn nicht selten werden beide Signalwege simultan aktiviert[17].

Anhand dieser verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen einer Asthmaerkrankung lässt sich eine Einteilung in Subgruppen, die sogenannten Endotypen, vornehmen. Anhand der Endotypen kann, vor allem für die Patienten mit schwerem Asthma, eine präzisere Therapiestrategie gewählt werden, welche auf Molekularebene in das Immunsystem eingreifen kann [31].

1.6 Zugelassene systemische immunmodulatorische Therapien

1.6.1 AIT

Die Allergen-Immuntherapie (AIT) stellt die älteste Form der Immunmodulation, mit Erstbeschreibung im Jahr 1911, dar. Später auch in der Asthmatherapie angewandt, dient sie als Behandlung für allergische Erkrankungen, welche eine Toleranz der Immunantwort durch die hochdosierte Gabe spezifischer Allergene erreicht. Die häufigsten Applikationsformen der Allergene sind die subkutane oder die sublinguale Gabe. Der Wirkmechanismus wird wie folgt beschrieben: Es werden regulatorische T- und B-Zellen aktiviert, welche über Signalkaskaden eine Toleranz hervorrufen und somit die Überreaktion des Immunsystems auf die Allergene reduzieren. Es kommt zusätzlich, nach einem initialen Anstieg, zu einer IgE-Reduktion und einem Abfall der Anzahl der eosinophilen Granulozyten [32]. Außerdem findet eine Induktion von IgG_4-

Antikörpern statt, welche die Bildung von Allergen-IgE-Komplexen verhindern [33]. Somit bewirkt die AIT eine Eindämmung der allergischen Atemwegsreaktion und der damit verbundenen Entzündung. Dieser Effekt kann bis zu 12 Jahre nach Absetzen der AIT anhalten [32]. Die AIT kann zusätzlich zu der bereits etablierten Asthma-Therapie zur Behandlung eines allergischen Asthma (und Rhinitis) bei Patienten mit leichtem bis moderaten Asthma genutzt werden [34].

1.6.2 Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten

Die Leukotriene gehören als Gewebsmediatoren zu der Gruppe der Eicosanoide. Durch Induktion inflammatorischer Prozesse wie der Einwanderung von Entzündungszellen in die Atemwege, einer erhöhten Mukussekretion, Atemwegsödemen sowie einer Beteiligung an dem strukturellen Umbau der Atemwege, stellen die Eicosanoide eine zentrale Rolle in der Pathogenese chronischer Atemwegserkrankungen dar. Es erfolgte daher ein Therapieansatz zur Unterdrückung dieses Signalweges durch die Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Montelukast) [35]. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Montelukast-Therapie weniger effektiv als eine ICS-Monotherapie ist [17]. Zusätzlich steht eine Montelukast-Therapie laut Studien der amerikanischen „Food and Drug Administration“ (FDA) in Assoziation mit potentiellen neuropsychiatrischen Nebenwirkungen, weshalb die FDA in 2020 eine Warnung für dieses Medikament im Sinne einer „Black Box Warning“ aussprach [36,37,38].

1.6.3 Biologika

Laut des amerikanischen nationalen Krebsinstitutes (National Cancer Institute, NCI) sind Biologika von lebenden Organismen oder deren Produkten hergestellte Substanzen [39]. Sie finden Einsatz sowohl in der Prävention, als auch Diagnose von Erkrankungen und deren Therapie. Die Gruppe der Biologika besteht aus Antikörpern, Interleukinen sowie sogenannten „Biological Agents“ (Impfstoffe) [40]. Für die Therapie des Asthma sind besonders die monoklonalen Antikörper relevant. Diese greifen an verschiedenen Stellen in die Pathophysiologie der Asthmaerkrankung ein und besitzen somit unterschiedliche Pathomechanismen [41], welche im Folgenden erläutert werden sollen.

Biologika-Klasse	Name des Biologikums	Applikations-Schema	Applikations-Weg	Selbstapplikation möglich?	Zulassung Ab
Anti-IgE	Omalizumab	alle 2-4 Wochen	s.c.	Ja	6 Jahren
Anti-IL-5-(R)	Mepolizumab	alle 4 Wochen	s.c.	Ja	6 Jahren
	Reslizumab	alle 4 Wochen	i.v.	Nein	18 Jahren
	Benralizumab	alle 4 / 8 Wochen	s.c.	Ja	18 Jahren
Anti-IL-4-R	Dupilumab	alle 2 Wochen	s.c.	Ja	6 Jahren
Anti-TSLP	Tezepelumab	alle 4 Wochen	s.c.	Ja	12 Jahren

Tabelle 2: **Zugelassene Biologika für schweres Asthma**
Aufgeführt sind die aktuell (Stand 2023) sechs zugelassenen Biologika für die Indikation „schweres Asthma“ mit Biologika-Klasse, Namen, Applikationsschema, Applikationsweg, ob eine Selbstapplikation möglich ist, sowie das Zulassungsalter. *Abkürzungen:* **IL** Interleukin, **s.c**. subkutan, **i.v.** intravenös [12].

Anti-IgE-Antikörper

Im Jahre 2005 wurde der Anti-IgE-Antikörper Omalizumab als erstes Biologikum für ein moderates bis schweres allergisches Asthma in Amerika zugelassen [42]. Es bindet an das Immunglobulin E, welches eine zentrale Rolle bei der Pathogenese des allergischen Asthma einnimmt, da es die Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, die Transkription von Zytokinen (IL-4, TNF, IL-6) und weitere entzündungsfördernde immunmodulatorische Prozesse induziert [42]. Omalizumab hemmt die IgE-Bindung an dessen Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten und stoppt somit die Signalkaskade der Entzündungsreaktion [41]. Zusätzlich zu der besseren Asthma-Kontrolle, welche nicht nur bei Patienten mit allergischem Asthma, sondern auch bei Patienten ohne einen Allergie-Bezug festgestellt werden konnte, wurden antivirale und antiautoimmune Effekte von Omalizumab nachgewiesen [17].

Anti-IL-5-Antikörper sowie Anti-IL-5-Rezeptor-alpha-Antikörper

Das Interleukin-5 regt die Entwicklung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark an. Diese Zellen sind maßgeblich an der Entwicklung des Asthma, vor allem des intrinsischen Asthma, beteiligt. Die folgenden Biologika greifen an dieser Stelle in die Pathophysiologie ein [17]. 2016 wurden die IL-5-Antikörper Mepolizumab und Reslizumab [43], 2017 der Anti-IL-5-Rezeptor-alpha-Anitkörper Benralizumab [41] für schweres intrinsisches Asthma zugelassen [44]. Mepolizumab und Reslizumab binden direkt an den IL-5-Liganden und verhindern somit die Bindung von IL-5 an seinen Rezeptor, während Benralizumab an den IL-5-Rezeptor bindet und somit eine Apoptose der eosinophilen und basophilen Zellreihen induziert [41]. Daraus resultiert,

dass Mepolizumab und Reslizumab die eosinophile Granulozyten-Konzentration im peripheren Blut senken. Benralizumab führt zu einer kompletten Depletion der eosinophilen Zellreihe [44], sowie zu einer starken Reduktion (>75%) der basophilen Granulozyten [45].

Anti-IL-4-/ Anti-IL-13-Rezeptor-Antikörper

Wie IL-5 stellt auch IL-4 einen Mediator in dem Atemwegsentzündungsprozess des Asthma dar. Der 2019 für schweres Asthma zugelassene Anti-IL-4-Rezeptor-Antikörper Dupilumab bindet an die α-Untereinheit des IL-4-Rezeptors und blockiert somit die inflammatorische Signaltransmission von IL-4. Da die alpha-Untereinheit von dem IL-4-Rezeptor auch bei dem IL-13-Rezeptor vorzufinden ist, wird auch dieser durch Dupilumab blockiert. Dies ist der Entzündungshemmung ebenfalls zuträglich [17,41]. Es wurde festgestellt, dass Dupilumab sowohl bei einem intrinsischen als auch extrinsischen Asthma eine Wirkung zeigt und dass im Gegensatz zu den Anti-IL-5(-Rezeptor)-Antikörpern die Konzentration der eosinophilen Granulozyten zunächst temporär ansteigt [17]. Zusätzlich zeigt die Forschung, dass sich Dupilumab ebenfalls auf die T-Zell-Populationen auswirkt und diese in ihrer Zahl reduziert [46,47].

Anti-TSLP

TSLP ist ein epitheliales Zytokin, welches als Reaktion auf Allergenexposition bzw. Umweltstimuli durch epitheliale Zellen der Atemwege freigesetzt wird und an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (**s. Abb. 8**). Brusselle et al. konnten in einer randomisierten kontrollierten Studie belegen, dass durch eine Blockade des TSLPs durch den monoklonalen Antikörper Tezepelumab bei Asthmapatienten mit einem unkontrollierten schweren Asthma eine Reduktion der jährlichen Exazerbationen um 56% erreicht werden konnte. Dies war sowohl bei dem Type-2-High-Asthma als auch beim Type-2-Low-Asthma der Fall. Zusätzlich reduzierte die Tezepelumab-Therapie die Anzahl der eosinophilen Zellen um 41% (bei Patienten mit <300/µl vor Therapiebeginn), sowie FeNO- und IgE-Werte. Insgesamt wurde eine Verbesserung der Lungenfunktion, der Asthma-Kontrolle sowie der Lebensqualität im Vergleich zu der Placebo-Gruppe erfasst. Zudem konnten keine Sicherheitsrisiken festgestellt werden [48].

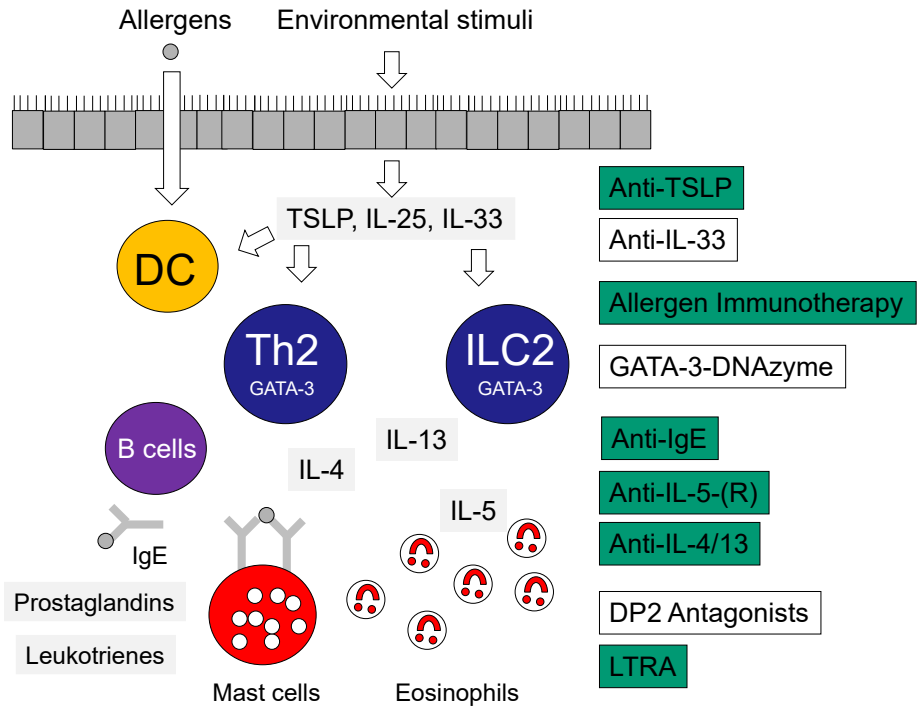


Abbildung 8: **Immunpathologie und Immunmodulation des „Type-2-High-Asthma“**
Es sind zwei Pathomechanismen einer Atemwegsinflammation eines „Type-2-High-Asthma“ zu unterscheiden: Zum einen über allergenpräsentierende dendritische Zellen (DC), welche T-Helferzellen (Th2) stimulieren und/oder zum anderen über die Aktivierung von ILC2. Epitheliale Zytokine (u.a. TSLP, IL-25, IL-33) können beide Pathomechanismen aktivieren. Sowohl Th2 als auch ILC2 exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA-3 und schütten Typ-2-Zytokine wie IL-4, IL-5 oder IL-13 aus. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten IgE-Produkion durch B-Zellen. Immunmodulatorische Medikamente, welche in diese Prozesse eingreifen und klinisch getestet wurden, sind in der Abbildung rechts aufgeführt. Die für die Therapie eines Asthma aktuell zugelassenen Therapieoptionen sind grün markiert. *Abkürzungen:* **DC** Dendritische Zellen, **Th2** T-Helferzellen Typ 2, **TSLP** Thymic Stromal Lymphopoietin, **IL** Interleukin, **ILC2** Typ-2 innate lymphoide Zellen, **DP2** Prostaglandin D2, **LTRA** Leukotrien-Rezeptor-Antagonist [17].

Effekte und Nebenwirkungen

Die genannten Biologika wirken auf molekularer Ebene in der Unterbindung der Signalkaskaden der Entzündungsprozesse des Asthma. Anti-IgE-Antikörper, Anti-IL-5(-R)-Antikörper, Anti-IL-4-/Anti-IL-13-Antikörper sowie Anti-TSLP bewirken bei Asthmapatienten eine verbesserte Asthma-Kontrolle, einen geringeren Langzeitverbrauch von OCS sowie eine um ca. 50% reduzierte Exazerbationsrate [17,41,49]. Bei Mepolizumab, Reslizumab, Benralizumab, Dupilumab und Tezepelumab wird zusätzlich eine Verbesserung der Lungenfunktion vermerkt [17,48], welche bei Omalizumab nur bei einem Teil der Patienten beobachtet werden konnte [50]. Die Biologika weisen bis auf die transiente Erhöhung der eosinophilen Granulozyten bei einer Dupilumab-Behandlung, keine gravierenden Nebenwirkungen auf, welche zu einer Beendigung der Therapie geführt hätten [17,48,51]. Biologika stellen somit aufgrund

ihrer guten Wirksamkeit sowie eines geringen Risikoprofils einen vielversprechenden Ansatz der modernen Asthmatherapie dar.

Obwohl die Biologika ein personalisiertes und spezifischeres Therapiekonzept als vorherige Therapieoptionen darstellen [17], sind sie jedoch nicht bei jedem Asthmapatienten erfolgreich und es verbleiben Patienten mit anhaltender Symptomatik. Deshalb ist weitere Forschung auf dem Gebiet der Biologika notwendig, um sie umfassender verstehen und besser einsetzen zu können. Unter anderem ist der Effekt der Biologika auf die humanen B-Zellen, als wichtiger Teil des Immunsystems, bislang nur wenig erforscht worden.

1.7 B-Zellen

1.7.1 Entwicklung

In den 1960er Jahren rückten die B-Zellen immer weiter in den Fokus der Forschung. Dies geschah aufgrund der Erkenntnis, dass die B-Zellen, wie auch die T-Zellen, eine erhebliche Rolle im adaptiven humanen Immunsystem spielen und die Quelle der menschlichen Antikörperproduktion sind [52,53]. Es wurden seitdem viele Erkenntnisse über die Komplexität der B-Zellen, wie deren Entwicklung, Funktionen sowie Subpopulationen gewonnen [53]. Bekannt sind uns heute B-1-Zellen, welche ihren Ursprung in der fetalen Leber haben und später hauptsächlich in serösen Körperhöhlen, wie der Bauchhöhle, verbleiben. Sie machen lediglich einen kleinen Anteil der B-Zellen aus. Zudem sind B-2-Zellen bekannt, welche aus dem Knochenmark emigrieren und sich zu follikulären B-Zellen oder Marginalzonen B-Zellen differenzieren können. Diese B-Zellen machen den Hauptteil der sich in den sekundär lymphatischen Organen befindenden B-Zellen aus [54,55].

Die Entwicklung der B-Zellen beginnt im Knochenmark (**s. Abb. 9**). Hier befinden sich zunächst die Vorläuferzellen der B-Zellen und es findet die Rekombination spezifischer Gensegmente der schweren Ketten (V_H, D_H, J_H) der Immunglobuline (Ig) statt. Die dadurch entstandenen Prä-B-Zellen werden auf ihre Funktionalität hin durch den Prä-B-Zell-Rezeptor (Pre-BCR) kontrolliert und autoreaktive Zellen werden eliminiert. Der Prä-B-Zell-Rezeptor besteht aus zwei schweren und leichten Ketten (später die

antigenbindende Untereinheit) als auch den signalübertragenden Komponenten Ig-α und Ig-β. Nur wenn dieser Komplex funktionsfähig ist, überlebt die B-Zelle und es wird ein intrazelluläres Signal für die Rekombination der leichten Ketten der Immunglobuline (V_L-J_L) erteilt, sodass es zur weiteren Differenzierung kommen kann. In Folge dessen, wird das Immunglobulin IgM als Teil des reifen, funktionierenden BCRs exprimiert (IgM^+) [52]. Die nun als „unreife B-Zellen" bezeichneten B-Zellen verlassen im Anschluss das Knochenmark und migrieren in die sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. die Milz. Hier findet die weitere Entwicklung statt (**s. Abb. 9**). Unreife B-Zellen, welche sich im Übergang zu reifen B-Zellen befinden, spielen hier eine wichtige Rolle. Diese Transitionalen B-Zellen (TB-Zellen) durchlaufen die Reifungsstadien T1 und T2 und erwerben in deren Verlauf IgD auf ihrer Zelloberfläche sowie weitere Oberflächenmoleküle, wie unterschiedliche „CD"-Proteine („Cluster of Differentiation") [52]. Neben den BCRs stellen diese membrangebundenen Glykoproteine wichtige Oberflächenmoleküle der B-Zellen dar [53]. Die immunphänotypischen Moleküle werden auf verschiedenen Zelloberflächen des humanen Immunsystems exprimiert und können zellspezifisch sein, wie z.B. das Protein CD19, welches B-Zell spezifisch ist. Die CD-Moleküle können eine Rezeptor- und/ oder Signalfunktion einnehmen. Sie können ebenfalls eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion zwischen den B-Lymphozyten und anderen Zellen einnehmen [56]. Die zirkulierenden TB-Zellen erwerben während ihres Reifungsprozesses unter anderem die Moleküle CD24 und CD38 [55]. Nach dem Reifungsprozess entstehen aus den TB-Zellen schlussendlich antigennaive, reife B-Zellen [52,55] (**s. Abb. 9**). Die reifen B-Zellen differenzieren sich entweder zu follikulären B-Zellen oder Marginalzonen B-Zellen. Follikuläre B-Zellen können durch Antigenstimulation aktiviert werden. Mit Hilfe der T-Zellen kommt es anschließend zu einer somatischen Hypermutation spezifischer Gensegmente der Immunglobuline sowie einem Ig-Klassenwechsel [52]. Es entstehen über den Zwischenschritt der Plasmablasten [57] die antikörperproduzierenden Plasmazellen oder die B-Gedächtniszellen. Diese können bei einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen eine Reinfektion verhindern. Die Marginalzonen B-Zellen können u.a. ebenfalls durch Antigenaktivierung eine Entwicklung zu kurzlebigen Plasmablasten durchmachen, welche eine hohe Menge an IgM produzieren können um somit schnell auf im Blut zirkulierende Antigene reagieren zu können[52] (**s. Abb. 9**).

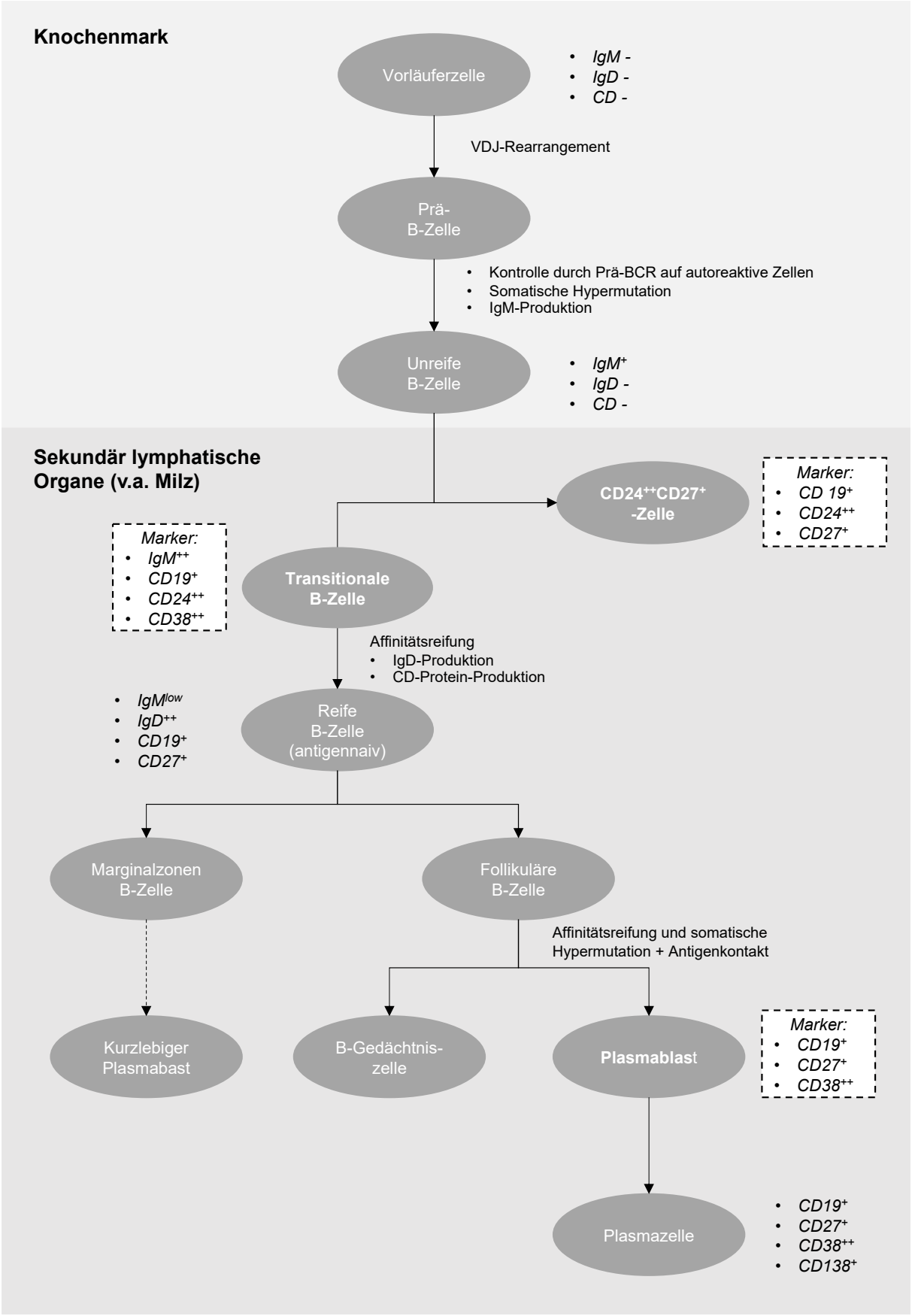


Abbildung 9: **Die Entwicklung der B-Zellen**
Von der Vorläuferzelle im Knochenmark ausgehend, beginnt die Entwicklung der B-Zellen. Nach VDJ-Rearrangements, der Eliminierung autoreaktiver Zellen sowie einer Immunglobulin-Produktion emigriert die nun unreife B-Zelle in die sekundär lymphatischen Organe (v.a. Milz). Hier reift die B-Zelle weiter.

Sie exprimiert CD-Oberflächenmoleküle und es kommt zur IgD-Produktion. Es entstehen B-Zellen mit verschiedenen Phänotypen wie die $CD24^{++}CD27^{+}$-Zelle oder die Transitionale B-Zelle, welche beide immunregulatorische Eigenschaften besitzen und somit zu den regulatorischen B-Zellen (Bregs) gehören. Die reife, antigennaive B-Zelle differenziert sich entweder zu Marginalzonen B-Zellen oder Follikulären B-Zellen. Diese können sich über Affinitätsreifung, somatische Hypermutation sowie Antigenkontakt zu B-Gedächtniszellen oder Plasmablasten entwickeln. Letztere haben ebenfalls immunregulatorische Eigenschaften. Durch weitere CD-Protein-Produktion und Reifung können sich Plasmablasten zu Plasmazellen entwickeln [58]. Die für diese Arbeit untersuchten Bregs wurden anhand spezifischer CD-Protein-Konstellationen (Marker) ausgewählt, welche in den weiß hinterlegten Kästen dargestellt sind. Sie stellen lediglich einen Teil der an der Zelloberfläche vorhandenen Proteine dar. Legende: - = keine Expression, low = niedrige Expression, + = intermediate; mittlere Expression, ++ = high; hohe Expression. *Abkürzungen:* **BCR** B-Zell-Rezeptor, **IgD** Immunglobulin D, **IgM** Immunglobulin M, **CD** Cluster of Differentiation.

1.7.2 Regulatorische B-Zellen (Bregs)

Die regulatorischen B-Zellen (Bregs) stellen eine Subpopulation der B-Zellen dar. Sie zeichnen sich durch antiinflammatorische Eigenschaften aus, welche auf die Produktion immunmodulatorischer Moleküle zurückzuführen sind. Eine einheitliche Klassifikation der Bregs mit genauer Definition ihrer Funktion und Phänotypen gibt es jedoch bislang nicht in der Literatur [54]. Der Großteil der humanen regulatorischen B-Zellen produziert jedoch das immunsupprimierende Interleukin-10. Einige andere Subgruppen produzieren die antiinflammatorischen Moleküle IL-35, Granzym B oder „Transforming growth factor-β“ (TGF-β) [54]. Bregs kann man anhand verschiedener Oberflächenmolekülen und Funktionen in mehrere Subpopulationen unterteilen. Die bereits erwähnten TB-Zellen sind hier eine der zu nennenden Subgruppen. Sie weisen unter anderem folgende Oberflächenproteine auf: CD19, CD24 und CD38. Die TB-Zellen inhibieren nach CD40-Stimulation die Differenzierung naiver T-Lymphozyten zu T-Helferzellen (Th1 und Th17) [54,59], welche ansonsten an inflammatorischen Prozessen und Pathomechanismen von Autoimmunkrankheiten beteiligt wären [60]. Dies geschieht hauptsächlich aufgrund des IL-10. Zusätzlich induzieren die $CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$-B-Zellen regulatorische T-Zellen [54], welche, ebenso wie die Bregs, eine wichtige Rolle in der Eindämmung inflammatorischer Prozesse einnehmen [61]. Als weitere Subgruppe der Bregs gelten die humanen B10-Zellen. Es wurde festgestellt, dass sich unter den Zellen mit den Oberflächenmolekülen $CD24^{++}CD27^{+}$ eine sehr hohe Anzahl von IL-10-produzierenden Zellen befindet. Somit erhielt diese Subpopulation der B-Zellen ihren Namen als „B10-Zellen“. Einhergehend mit der IL-10-Produktion ist die Inhibition der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-α-Produktion der Monozyten [54]. TNF-α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches aufgrund mehrerer intrazellulären Signale zu einer Apoptose oder Nekrose der jeweiligen Zelle führt und somit zu einer Entzündungsreaktion beiträgt [62]. Auch Plasmablasten weisen

immunsuppressive Eigenschaften auf und werden ebenfalls zu den regulatorischen B-Zellen gezählt. Plasmablasten mit dem Phänotyp $CD19^{+}CD27^{+}CD38^{++}$ inhibieren aufgrund ihrer IL-10-Produktion dendritische Zellen in ihrer Funktion pathogene T-Zellen zu generieren [63]. Weitere IL-10-produzierende Bregs sind Br1-Zellen, welche durch ihre IL-10-Produktion antigenspezifische T-Zell-Proliferationen eindämmen, sowie $CD9^{+}$-Zellen und $CD5^{+}CD1d^{+}$-Zellen, welche die durch Th2 und Th17 hervorgerufenen Entzündungsreaktionen reduzieren [54].

1.7.3 Rolle von Bregs in Krankheiten

Die Bregs sind bei der Regulierung entzündlicher Prozesse von zentraler Bedeutung. Die Frage, wie sich die Populationen dieser B-Zellen bei bestimmten Krankheitsbildern verhalten, ist dementsprechend naheliegend. Durch Forschungen auf diesem Gebiet, sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen, ist mittlerweile bekannt, dass bei Infektionskrankheiten die viralen, bakteriellen oder parasitären Erreger zu einem vermehrten Aufkommen der Bregs führen. Ähnlich verhält es sich bei Krebserkrankungen. B-Zellen können das Tumorwachstum beeinflussen und sind während der Erkrankungszeit vermehrt vorzufinden [54]. Anders verhält es sich bei Autoimmunkrankheiten. Hier ist eine niedrigere Zellzahl bzw. IL-10-Produktion der Bregs als bei Nicht-Erkrankten zu verzeichnen. Dies schließt Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose, Rheumatische Arthritis, Systemischer Lupus erythematodes und das Sjögren Syndrom ein. Ähnlich verhält es sich bei Erkrankungen die mit Allergien in Verbindung stehen wie die allergische Dermatitis und Nahrungsmittelunverträglichkeiten. Lediglich bei der allergischen Rhinitis konnten neben erniedrigten Konzentrationen einiger regulatorischen B-Zell-Subpopulationen ebenso erhöhte Zellzahlen von Bregs mit dem Phänotyp $CD19^{+}CD24^{++}CD27^{+}$ beobachtet werden [54]. Bei allergischem Asthma zeigt sich eine heterogene Studienlage: Verschiedene Autoren postulieren, dass Patienten mit allergischem Asthma weniger Bregs mit dem Phänotyp $CD19^{+}CD24^{++}CD27^{+}$ haben [64,65], sowie dem Phänotyp $CD9^{+}$ [66], während andere Studien belegen, dass keine verminderte Anzahl von Bregs bei Patienten mit allergischem Asthma vorliegen [67-69]. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Bregs mit dem Phänotyp $CD19^{+}CD24^{++}CD27^{+}$ bei Patienten mit allergischem Asthma eine verringerte IL-10-Produktion aufweisen [67].

1.8 Fragestellung

B-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunantwort. Die regulatorischen B-Zellen, insbesondere die sogenannten TB-Zellen, sind relevant bei der Eindämmung inflammatorischer Prozesse des humanen Immunsystems. Diese entzündlichen Ereignisse werden unter anderem bei Erkrankungen wie dem Asthma gefunden. Die vielversprechenden, seit den 2010er Jahren in der Therapie eines schweren Asthma eingesetzten Biologika sind immunmodulatorische Medikamente. Bis heute sind jedoch die Wirkungen der Biologika Benralizumab und Dupilumab auf die regulatorischen B-Zellen nicht bekannt. Dieses Wissen wäre für die Asthma-Therapie jedoch von großem Interesse, da die daraus resultierenden Erkenntnisse den Einsatzbereich der Biologika bzw. den Umfang der Auswirkung der Biologika auf das menschliche Immunsystem genauer definieren könnten. Zusätzlich ist zu ergründen, ob es einen Unterschied zwischen Bregs bei erwachsenen Patienten mit schwerem Asthma und gesunden Kontrollen gibt. Bislang existieren hierzu lediglich Studien, welche sich mit überwiegend milden-moderaten Asthmaformen beschäftigen.

Mit der vorliegenden Dissertation sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Gibt es Unterschiede in der Anzahl der TB-Zellen im Blut zwischen Patienten mit schwerem Asthma und gesunden Kontrollen?

- Kommt es während der Therapie mit dem Anti-IL-5(-R)-Antikörper Benralizumab oder dem Anti-IL-4/-IL-13-Antikörper Dupilumab zu einer Veränderung der Subpopulationen der regulatorischen B-Zellen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

2.1.1 Rekrutierung von Patienten und Probanden

In dem Zeitraum Juli 2020 bis April 2021 wurden in der Sprechstunde der Asthma-Ambulanz von Herrn Prof. M. Lommatzsch im Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Rostock, Patienten mit schwerem Asthma für diese Studie rekrutiert. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien wurden die Patienten ausführlich über den Ablauf und das Ziel der Studie aufgeklärt. Die Patienten wurden anschließend gebeten, eine schriftliche Einverständniserklärung zu unterzeichnen und konnten somit in die Studie aufgenommen werden. In dem Zeitraum Juli 2020 bis September 2021 wurden gesunde Kontrollen gesucht. Diese wurden angelehnt an das Alter und Geschlecht der jeweiligen Studienpatienten ausgewählt. Nach Erfüllung der Einschlusskriterien wurden die Probanden ebenfalls über den Ablauf und das Ziel der Studie aufgeklärt. Nach Unterschreiben der schriftlichen Einverständniserklärung wurden die Probanden in die Studie aufgenommen.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien für Patienten:

- Schweres Asthma gemäß „GINA Main Report 2020/2021“
- Keine Angabe einer Prednisolon-Dauertherapie
- Keine laufende Biologika-Therapie
- Patient ist nach Ansicht des behandelnden Arztes ein passender Kandidat für eine Dupilumab- oder Benralizumab-Therapie

Ausschlusskriterien für Patienten:

- Andere schwere chronisch-entzündliche Erkrankungen
- Einnahme von Immunsuppressiva
- Schwerwiegende andere Lungenerkrankungen
- Unfähigkeit, in die Studie einzuwilligen

Einschlusskriterien für Probanden:

- Keine schwerwiegenden Lungenerkrankungen, inklusive Asthma
- Keine chronisch-entzündlichen Erkrankungen
- Keine Einnahme von immunsupprimierenden Medikamenten
- Fähigkeit in die Studie einzuwilligen

Ausschlusskriterium für Probanden:

- Sofern die oben genannten Einschlusskriterien nicht zutreffen

2.1.3 Ablauf der Studie

Der Einschluss der Patienten und der Probanden konnte nach Erfüllung der Einschlusskriterien, einer ausführlichen Aufklärung über die Ziele und den Ablauf der Studie, sowie nach der Unterzeichnung der Einverständniserklärung erfolgen. Es wurden mit den Patienten anschließend zwei weitere Termine nach 1 Monat, sowie nach 6 Monaten abgestimmt. Bei jedem dieser drei Termine sah die Studie in den Räumlichkeiten der Pneumologie der Universitätsklinik eine Lungenfunktionsmessung mittels Ganzkörperplethysmographie (**s. Abschnitt 2.2**) sowie eine Erhebung des FeNO-Wertes vor (**s. Abschnitt 2.3**). Zusätzlich erfolgte eine Blutentnahme (**s. Abschnitt 2.4**). Ein Teil der Blutproben wurden sofort in das Zentrallabor der Universität Rostock gebracht (**s. Abschnitt 2.5**), während der andere Teil für die Durchflusszytometrie bzw. die Gesamt-IgE-Bestimmung weiterverarbeitet wurde (**s. Abschnitt 2.6 und 2.7**). Zuletzt wurden die Studienteilnehmer gebeten die drei Fragebögen ACT, ACQ6 und SGRQ auszufüllen (**s. Abschnitt 2.8**). Zusätzlich erhielt jeder Patient bei dem ersten Termin vor Ort das Biologikum Benralizumab (30 mg) oder Dupilumab (300 mg) als subkutane Injektion. Anschließend mussten die Patienten 120 Minuten zur Nachbeobachtung vor Ort warten. Den Patienten war es freigestellt sich im Anschluss in den von den Medikamentenherstellern vorgegebenen Intervallen entweder per Selbstinjektion mit einem „Pen“ das Medikament zu verabreichen, oder dies in der Asthma-Ambulanz oder in einer Arztpraxis von Fachpersonal vornehmen zu lassen. Bei den Kontrollprobanden erfolgte lediglich ein Termin, ebenfalls mit der Erhebung einer Bodyplethysmographie, einem FeNO-Wert sowie einer Blutentnahme. Diese Blutproben wurden ebenfalls umgehend zur Analyse in das Zentrallabor gebracht und für die Durchflusszytometrie präpariert.

2.1.4 Votum der Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde bei der Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern unter den folgenden Nummern beantragt A 2019-0126 und A 2019-0135. Es bestanden keine berufsethischen oder berufsrechtlichen Bedenken gegen die Durchführung dieser Studie.

2.2 Bodyplethysmographie

Material

- Ganzkörperplethysmograph Master Screen Body mit Auswertungssoftware [Jaeger, Würzburg, D]
- Mundstück und Nasenklemme [Jaeger, Würzburg, D]

Abbildung 10: Ganzkörperplethysmograph
Abgebildet ist der „Master Screen Body“ mit Auswertungssoftware von der Firma Jaeger der Abteilung für Pneumologie.

Methode

Die Ganzkörperplethysmographie stellt eine Lungenfunktionsuntersuchung dar, welche statische Lungenvolumina wie die totale Lungenkapazität oder die Residualkapazität, sowie den Atemwegswiderstand bestimmen kann. Das Prinzip beruht darauf, dass das Produkt aus Volumen und Druck konstant ist und deshalb bei Veränderungen des Drucks Rückschlüsse auf das intrathorakale Gasvolumen gezogen werden können. Der Patient sitzt für diese Messung in einer luftdicht

abgeschlossen Kabine und ist über ein Mundstück an einen Pneumotachographen angeschlossen, welcher die Atemstromstärke misst. Da es sich um einen abgeschlossenen Raum handelt, können Druckschwankungen innerhalb der Kabine aufgrund der Atmung und der damit verbundenen Volumenveränderung des Patienten, genau detektiert werden. Hierdurch entsteht ein Druck-Strömungsdiagramm, welches eine exakte Beschreibung des Strömungswiderstands über den gesamten Atemzyklus des Patienten hinweg erlaubt. Die Bodyplethysmographie umfasst zusätzlich auch die Messungen einer herkömmlichen Spirometrie, wobei mobilisierbare Lungenvolumina sowie Strömungsgeschwindigkeiten erfasst werden können. Insgesamt kann die Ganzkörperplethysmographie also sowohl statische als auch dynamische Lungenvolumina erfassen und stellt somit eine detaillierte und umfassende Untersuchungsmethode dar (**Tab. 3**).

Parameter	Definition	Abkürzung	Einheit
Vitalkapazität	Gasvolumen, welches maximal geatmet werden kann (sowohl in- als auch exspiratorisch)	VC (IN/EX)	Liter
Inspiratorische Vitalkapazität	Atemvolumen, welches maximal eingeatmet werden kann	IVC	Liter
Residualvolumen	Volumen, welches sich nach maximaler Exspiration noch in der Lunge befindet (nicht mobilisierbar)	RV	Liter
Intrathorakales Gasvolumen	Volumen, welches sich endexspiratorisch noch in der Lunge befindet	ITGV	Liter
Forcierte exspiratorische Vitalkapazität	Atemvolumen, welches nach maximaler Inspiration forciert ausgeatmet werden kann	FVC	Liter
Forciertes exspiratorisches Volumen in 1 Sekunde (Einsekundenkapazität)	Atemvolumen, welches nach maximaler Inspiration forciert in der ersten Sekunde ausgeatmet werden kann	FEV1	Liter
Tiffeneau-Index	Quotient aus FEV1 und FVC (Sollte beim Lungengesunden über 70% liegen)	FEV1/FVC	%
Maximaler exspiratorischer Fluss (exspiratorischer Spitzenfluss)	Maximale Atemstromstärke bei forcierter Ausatmung	PEF	Liter/s
Maximaler exspiratorischer Fluss bei 75% der forcierten Vitalkapazität	Atemstromstärke, wenn 75% der forcierten Vitalkapazität noch auszuatmen sind	MEF75	Liter/s
Maximaler exspiratorischer Fluss bei 50% der forcierten Vitalkapazität	Atemstromstärke, wenn 50% der forcierten Vitalkapazität noch auszuatmen sind	MEF50	Liter/s
Maximaler exspiratorischer Fluss bei 25% der forcierten Vitalkapazität	Atemstromstärke, wenn 25% der forcierten Vitalkapazität noch auszuatmen sind	MEF25	Liter/s
Atemwegswiderstand	Druckdifferenz (treibende Kraft) zwischen Mund und Alveole bei einer Atemstromstärke von 1 Liter/Sekunde	Raw	kPa*s/l
Effektiver Atemwegswiderstand (nach Matthys)	Druckdifferenz (treibende Kraft) zwischen Mund und Alveole bei einer Atemstromstärke von 1 Liter/Sekunde	Reff	kPa*s/l
Funktionelle Residualkapazität	Luftvolumen, welches nach einer normalen Exspiration in der Lunge verbleibt	FR	Liter
Totale Lungenkapazität	Gesamtes Lungenvolumen (RV+IVC)	TLC	Liter

Tabelle 3: Mit der Bodyplethysmographie messbare Parameter

Durchführung

Der Patient wird gebeten, in der Kabine (**s. Abb. 10**) Platz zu nehmen. Er soll nun das mit dem Pneumotachographen verbundene Mundstück mit dem Mund umschließen und bekommt eine Nasenklemme aufgesetzt. Im Anschluss wird die Tür der Kammer verschlossen und der Patient wird gebeten, ruhig ein- und auszuatmen. Nun ist nur eine kurze Wartezeit bis zum Start der Messungen notwendig, da es aufgrund der modernen Software zu einer schnellen Kompensation der sich durch den Körper erwärmenden Luft erfolgt. Zuerst erfolgt die Messung des Atemwegswiderstands bei Ruheatmung. Hierzu wird nach Ausatmung des Patienten in endexspiratorischer Atemruhelage das Atemrohr durch eine Klappe verschlossen. Der Patient soll nun gegen den Widerstand normal einatmen, wodurch das intrathorakale Gasvolumen bestimmt werden kann. Anschließend folgen weitere Atemmanöver einer herkömmlichen Spirometrie: Der Patient wird gebeten, maximal auszuatmen, dann direkt maximal einzuatmen und im Anschluss so schnell wie möglich maximal auszuatmen. Nach der nächsten regulären Einatmung ist die Untersuchung beendet und der Patient kann die Kabine verlassen.

2.3 FeNO-Wert-Messung

Material

- FeNO-Messgerät NIOX Vero® [Circassia, Oxford, England]
- Mundstück [Circassia, Oxford, England]

Abbildung 11: Das FeNO-Messgerät
Abgebildet ist das „NIOX Vero ®“ mit Mundstück der Firma Circassia der Abteilung für Pneumologie.

Methode und Durchführung

Das FeNO-Messgerät „NIOX Vero®“ von der Firma Circassia beruht auf dem Messverfahren der Chemilumineszenz-Analyse, welche auf der chemischen Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Ozon basiert. Das in das Messgerät hineingeatmete NO der Ausatemluft des Patienten reagiert mit dem in dem Gerät vorhandenen Ozon, welches aus dem Sauerstoff der Umgebungsluft gewonnen wird. Es entsteht Stickstoffdioxid. Dies emittiert Lichtquanten, welche photometrisch gemessen werden und proportional zu der gesuchten NO-Konzentration der Ausatemluft stehen [70]. Für die Messung wird der Patient/Proband gebeten, sich vor das Gerät zu setzen. Der Patient soll wie gewöhnlich ausatmen und dann durch das Mundstück NO-freie Luft bis zur Totalkapazität einatmen. Anschließend wird der Patient aufgefordert durch das Mundstück nahe bis zum Residualvolumen auszuatmen. Dies soll in einer Intensität von ca. 50 ml/s erfolgen, sodass ein Druck im Bereich von circa 10 cmH2O (entspricht 7,36 mmHg) für mehrere Sekunden gehalten werden kann. Einige Sekunden nach Beendigung der Messung wird der Wert des ausgeatmeten Stickstoffmonoxids auf dem Display des Messgerätes in der Einheit ppb angezeigt. Messwerte unter 25 ppb bei Erwachsenen sind mit einer geringen Wahrscheinlichkeit einer eosinophilen Entzündung zu interpretieren. Werte von über 50 ppb sprechen für eine hohe Wahrscheinlichkeit einer eosinophilen Entzündung [71].

2.4 Blutentnahme

Material

- Stauschlauch
- Sterile Wattetupfer [Hartmann, Heidenheim, D]
- Hautdesinfektion mit Octeniderm ® [Schülke & Mayr, Norderstedt, D]
- Safety-Multifly®-Kanüle, 21G, 0,8 x 19 mm [Sarstedt, Nümbrecht, D]
- S-Monovette® EDTA 2,6 ml [Sarstedt, Nümbrecht, D]
- S-Monovette® Serum 7,5 ml [Sarstedt, Nümbrecht, D]

Durchführung

Zuerst erfolgten die Hautdesinfektion sowie die Anlage des Stauschlauches. Anschließend wurde allen Patienten sowie Probanden Blut mittels der Butterfly-Kanüle entnommen. Es wurden folgende Röhrchen abgenommen:

- 1 EDTA-Röhrchen (2,6 ml) zur Differentialblutbildbestimmung
- 1 EDTA-Röhrchen (2,6 ml) zur FACS-Analyse der B-Zellen
- 1 Serum-Röhrchen (7,5 ml) zur Gesamt-IgE-Bestimmung

2.5 Messungen im Zentrallabor

Die Laborbestimmungen des Differentialblutbildes erfolgten im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin im Zentrallabor der Universität Rostock. Das Differentialblutbild wurde mit einem hämatologischen Analysegerät (XE, 2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt.

2.6 Durchflusszytometrie

Material

- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400 R [Heraeus, Hanau, D]
- Zentrifuge Multifuge 1L- R [Thermo Fisher Scientific, MA, USA]
- Durchflusszytometer FACSLyric™ [Becton Dickinson, Heidelberg, D]
- FACS-Software BD FACS Suite v1.3 [Becton Dickinson, Heidelberg, D]
- Vortexer MS 3 digital [IKA, Staufen, D]
- Pipette Research 100 - 1000 µl [Eppendorf, Hamburg, D]
- Pipette Research 20 - 200 µl [Eppendorf, Hamburg, D]
- Pipettenspitze 1000 µl [Eppendorf, Hamburg, D]
- Pipettenspitze 200 µl [Eppendorf, Hamburg, D]
- Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf, Hamburg, D]
- Durchflusszytometrie Röhrchen 5 ml [Sarstedt, Nümbrecht, D]
- PBS (Phosphate buffered saline) [Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D]
- FACS Lysing Solution [Becton Dickinson, Heidelberg, D]
- Monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper (**s. Tab. 4**)

Methode

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen messen und sortieren. Hierzu fließen die Zellen in einem Mikrokanal (Küvette) innerhalb eines flüssigen Mediums durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem monochromatischen Laserstrahl vorbei. Im Anschluss kann die Ablenkung des Laserstrahls durch die bestrahlte Zelle mittels Photodetektoren gemessen werden. Hierbei kann zum einen das Vorwärtsstreulicht (Forward scatter = FSC) entlang der Achse des Laserstrahls erfasst werden, welches Auskunft über die Größe der Zelle gibt. Zum anderen wird die Seitwärtsstreuung (Side scatter = SSC) des Laserstrahls detektiert, welche Rückschlüsse über Binnenstrukturen der Zelle, wie die Granularität des Zytoplasmas, zulässt. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) stellt eine spezielle Form der Durchflusszytometrie dar und beruht auf der Interkation zwischen Antigen und Antikörper. Hierfür werden spezifische Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Anschließend werden die Zellen, welche die zu untersuchenden Antigene in Form von Oberflächenproteinen tragen, aus den Blutprodukten isoliert und mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern versetzt. Das für diese Arbeit verwendete FACS-Gerät enthält drei Laser mit den Wellenlängen 405 nm, 488 nm sowie 605 nm, welche sechs Fluoreszenzfarbstoffe anregen können (**s. Tab. 4**). Durch den Laserstrahl mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt, emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Photonen, welche anschließend durch Photodetektoren erfasst werden können. Die Anzahl der gemessenen Photonen entspricht der Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes der jeweiligen Zelle. Hieraus ergibt sich die Menge gebundener Antikörper an die gefragten Oberflächenantigene, welche somit quantifiziert werden können. Die während der Messung erhobenen Daten zu den Oberflächenproteinen der Zellen, sowie die über das FSC und SSC erhobenen Informationen, können im Anschluss in Koordinatensystemen (Dotplots) dargestellt werden. Die x- und y-Achse des Koordinatensystems werden durch zwei der gemessenen Parameter gebildet und jede Zelle wird je nach ihrer Größe, Granularität oder Menge an gemessenen Oberflächenmarkern an dem dazugehörigen Punkt eingetragen. Hieraus ergeben sich Punktewolken, welche Subpopulationen mit spezifischen Charakteristika der gemessenen Zellgesamtheit darstellen. Um diese Subpopulationen besser auswerten zu können werden sogenannte „Gates“ eingesetzt. Hierbei werden ausgewählte Punktewolken eingekreist können dadurch gezählt werden. Dadurch lässt sich im

Anschluss der prozentuale Anteil der sich im Gate befindenden Zellen an der Gesamtpopulation errechnen.

Durchführung

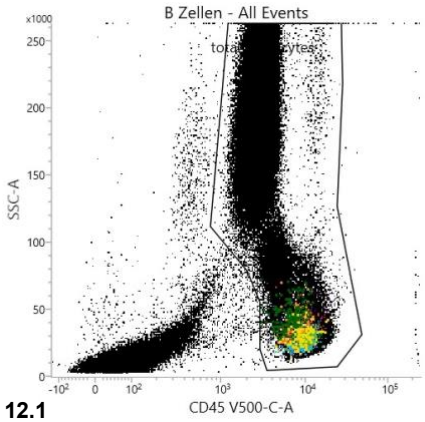
Die durchflusszytometrische Messung erfolgte im Universitätsklinikum Rostock, Zentrum für Innere Medizin, in dem zu der Pneumologie gehörenden Immunologischen Labor. Zuerst wurde der Antikörper-Ansatz (**s. Tab. 4**) hergestellt. Im Anschluss wurden 100 µl Vollblut des EDTA-Blutes der Patienten/Probanden hinzugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 1 ml FACS Lysing Solution hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten im Dunkeln. Daraufhin wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 420 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands erfolgte eine Waschung. Hierfür wurden 1 ml Waschpuffer hinzugegeben, mit anschließender erneuter Zentrifugation der Zellen, ebenfalls mit 420 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen. Schließlich wurden die Zellen in 400 µl PBS resuspendiert und mithilfe eines Vortexers durchmischt. Fertig präpariert, konnten die Zellen im Anschluss mittels des 6-Farben-Durchflusszytometers gemessen werden.

Antikörper	Farbstoff	Klon	Menge	Hersteller	Anregende Wellenlänge	Emittierende Wellenlänge
Anti-IgD	FITC	IA6-2	5 µl	BioLegend	488 nm	520 nm
Anti-CD27	PE	M-T271	5 µl	BioLegend	488 nm	575 nm
Anti-CD24	PerCP-Cy5.5	ML5	5 µl	BioLegend	488 nm	690 nm
Anti-CD-38	APC	HIT2	5 µl	BioLegend	633 nm	680 nm
Anti-CD19	BV421	HIB19	5 µl	BD Biosciences	405 nm	423 nm
Anti-CD45	V500-C	2D1	5 µl	BD Biosciences	405 nm	499 nm

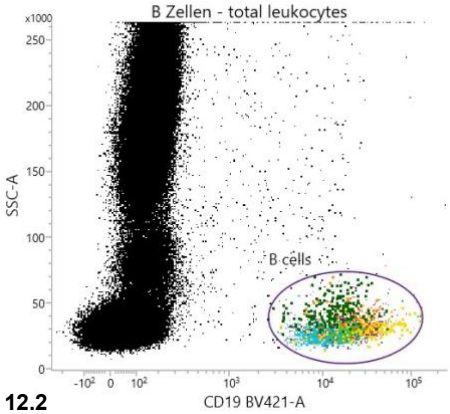
Tabelle 4: Antikörper für die FACS
Es sind die in dieser Studie verwendeten Antikörper, sowie deren Farbstoff, Klon, die genutzte Menge, der Hersteller sowie die anregende und emittierende Wellenlänge aufgeführt. *Abkürzungen:* I**gD** Immunglobulin D, **CD** Cluster of Differentiation, **FITC** Fluorescein IsoThioCyanate, **PE** PhycoErythrin, **PerCP-Cy5.5** Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanine 5.5, **APC** AlloPhycoCyanin, **BV421** Brilliant Violet 421, **V500-C** Herstellereigenname.

Analyse der Zellen

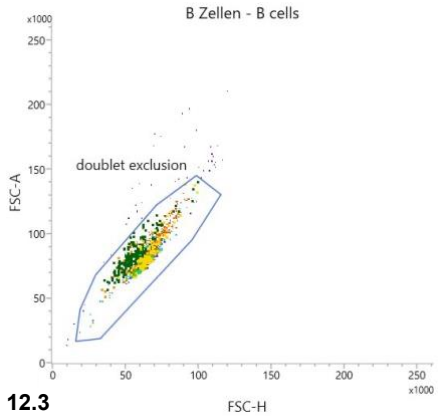
Die Zellanalyse erfolgte mit der FACS-Software „BD FACS Suite v1.3“. Zuerst wurden alle Zellen mit dem Oberflächenmarker CD45, welcher spezifisch für Leukozyten ist, mittels einer CD45/SSC-Darstellung identifiziert. Anschließend wurde um die Zellpopulation mit der passenden Granularität (ablesbar auf der SSC-Achse) ein Gate gezogen. Somit wurden alle sich in der Zelllösung befindlichen Leukozyten durch ihre Granularität und CD45-Oberflächenproteine kenntlich gemacht (**s. Abb.12.1**). Im nächsten Schritt erfolgte die Darstellung der B-Zellen, als Subgruppe der Leukozyten. Es ist bekannt, dass CD19 als spezifisches Oberflächenprotein für B-Zellen dienen kann. Aus diesem Grund wurde das Leukozyten-Gate nun in eine CD19/SSC-Darstellung gebracht. Hier konnte die Population, welche CD19-Oberflächenantigene sowie eine geringe Granularität aufwies, per Gate ermittelt werden (**s. Abb. 12.2**). In der nächsten Hierarchieebene des Gatings folgte der Doubletten Ausschluss der B-Zellen. Dies dient dazu, aneinanderhaftende, die Ergebnisse verfälschende Zellen aus der Population auszuschließen. Hierfür wurde eine FSC-H/FSC-A-Darstellung gewählt. Somit konnten per Gate zu stark von der Größennorm abweichende Zellen ausgeschlossen werden (**s. Abb. 12.3**). Die verbliebene Zellpopulation waren einzeln vorliegende B-Zellen. Wie in der **Abb. 12.4** gezeigt, wurde im Anschluss eine IgD/CD27-Übersicht erstellt, welche Auskunft über den Reifegrad der B-Zellen geben kann, da weniger differenzierte B-Zellen noch IgD bilden, während reifere B-Zellen kein IgD mehr bilden und CD27 exprimieren („Switched Memory“). Eine Hierarchiestufe weiter, wurde die Population der „Switched Memory“-Darstellung per Gate ausgewählt. Aus dieser Population wurden anschließend in der CD27/CD38-Grafik die $CD19^{+}CD27^{+}CD38^{++}$-Zellen (Plasmablasten) identifiziert (**s. Abb. 12.5**). Wieder ausgehend von der B-Zell-Population nach Doubletten Ausschluss, wurden noch zwei weitere B-Zell-Subpopulationen per Gates ermittelt, für die in der Literatur eine immunregulatorische Funktion beschrieben wird. Zum einen die $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen in der CD24/CD27-Darstellung (**s. Abb. 12.6**), zum anderen die Transitionalen B-Zellen, welche aufgrund ihrer spezifischen CD-Oberflächenprotein-Kombination $CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$ in der CD24/CD38-Darstellung ermittelt werden konnten (**s. Abb. 12.7**). Da sich die innerhalb eines jeden Gates befindenden Populationen durch die Software gezählt werden, erhält man somit Rückschlüsse auf den prozentualen Anteil der Subpopulationen an der gesamten Anzahl der B-Zellen.



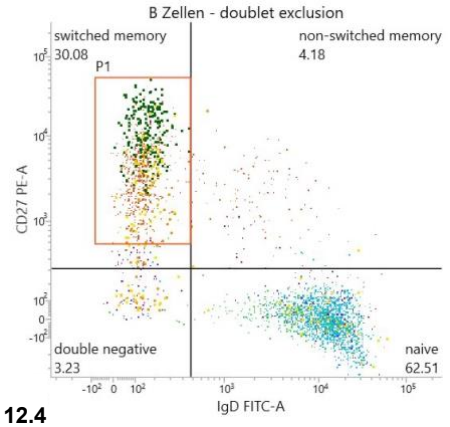
12.1



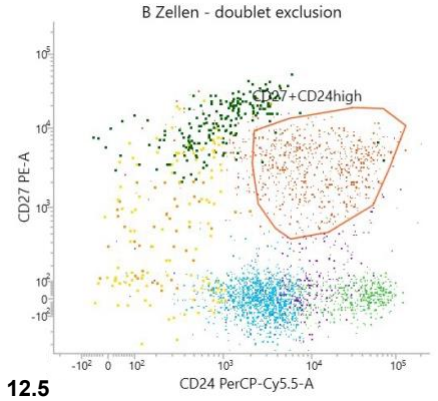
12.2



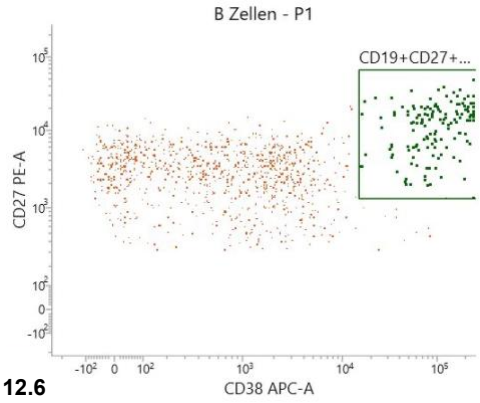
12.3



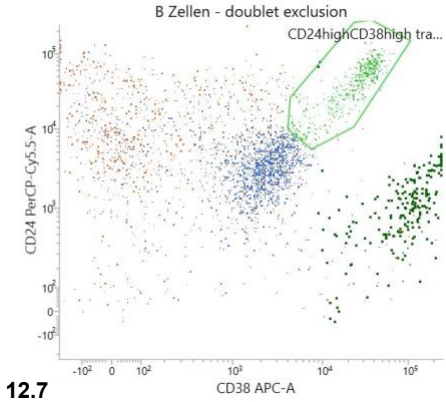
12.4



12.5



12.6



12.7

Abbildung 12 (12.1-12.7): Dotplots der B-Zell-Gating-Strategie
12.1: CD45/SSC-Darstellung, Leukozyten-Gate. **21.2:** CD19/SSC-Darstellung, B-Zellen-Gate. **12.3:** FSC/FSC-Darstellung, Doubletten-Exklusions-Gate. **12.4:** IgD/CD27-Darstellung, „Switched-Memory"-Gate. **12.5:** CD24/CD27-Darstellung, $CD19^{+}CD24^{++}CD27^{+}$-Gate. **12.6:** CD27/CD38-Darstellung,

$CD19^{+}CD27^{+}CD38^{++}$-Plasmablasten-Gate. **12.7:** CD24/CD38-Darstellung, $CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$-Tranisitional-B-cells-Gate. *Abkürzungen:* **FSC** Forward Scatter, **SSC** Side Scatter, **CD** Cluster of Differentiation, **IgD** Immunglobulin D. *Fluoreszenzfarbstoffe*: **V500-C** Herstellereigenname, **BV421** Brilliant Violet 421, **FITC** Fluorescein IsoThioCyanate, **PE** PhycoErythrin, **PerCP-Cy5.5** Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanine 5.5, **APC** AlloPhycoCyanin,

2.7 Gesamt-IgE-Messung

Material

- S-Monovette® Serum 7,5 ml [Sarstedt, Nümbrecht, D]
- Immunoassay Analysator Phadia 100 [Thermo Scientific, MA, USA]
- Phadia Information Data Manager Software [Thermo Scientific, MA, USA]
- Total IgE Anti-IgE ImmunoCAP (Anti-IgE) [Thermo Scientific, MA, USA]
- Total IgE Kit – Konjugatlösung: 50 µl Anti-human IgE Konjugat, ß-Galaktosidase markiert [Thermo Scientific, MA, USA]
- Entwicklerlösung: 50 µl Developing Solution 0,01% 4-Methylumbelliferyl-ß-D-Galaktosid [Thermo Scientific, MA, USA]
- Waschlösung: 17,2 ml washing solution additive + 80 ml washing solution concentrate in 1 l Aquadest aufgelöst [Thermo Scientific, MA, USA]
- Stopp-Lösung: 600 µl 4% Na_2CO_3-Lösung [Thermo Scientific, MA, USA]

Methode und Durchführung

Das Patientenblut aus dem Serum-Röhrchen wurde zunächst bei 3500 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. Für eine Gesamt-IgE-Bestimmung mittels ImmunoCAP-Testsystem in dem Immunoassay Analysator Phadia 100, werden 40 µl Patientenserum benötigt. Zusätzlich werden Waschlösung, Anti-IgE ImmunoCAP, 50 µl Konjugatlösung (Anti-human IgE Konjugat, ß-Galaktosidase markiert), 50 µl Entwicklerlösung (0,01% 4-Methylumbelliferyl-ß-D-Galaktosid) sowie 600 µl Stopp-Lösung (4% Natriumcarbonat) benötigt. Anschließend wurde in einem automatischen Prozess das Patientenserum in dem Immunoassay Analysator Phadia 100 auf Gesamt-IgE hin analysiert.

2.8 Fragebögen

Fragebögen stellen ein einfaches, kostengünstiges Mittel dar, um die Asthma-Kontrolle bei Patienten mit schwerem Asthma zu bestimmen. Klinisch hat sich wiederholt gezeigt, dass die Asthma-Kontrolle der Patienten sowohl von Ärzten als

auch von den Patienten überschätzt wurde und es somit zu vermeidbaren, gesundheitsgefährdenden Exazerbationen gekommen ist. In der Hoffnung, eine drohende Verschlechterung des Asthma besser detektieren zu können, hat sich der Einsatz der im Folgenden erläuterten Fragebögen etabliert [72, 73].

2.8.1 ACT

Der Fragebogen „Asthma Control Test“ soll messen, wie sehr die Patienten ihr Asthma und die Asthma-Symptomatik innerhalb der letzten vier Wochen unter Kontrolle hatten. Es werden Symptome wie eine verminderte Leistungsfähigkeit des Patienten, Kurzatmigkeit sowie Abhusten und Luftnot nach dem Aufwachen abgefragt. Weiterhin wird die Frequenz der Nutzung eines eventuellen Notfallmedikaments sowie das subjektive Empfinden der Asthma-Kontrolle ermittelt. Auf jede Frage gibt es fünf Antwortmöglichkeiten, welche mit 1 bis 5 Punkten bewertet werden. Somit können insgesamt mindestens 5 und maximal 25 Punkte erreicht werden. 20-25 Punkte stehen hierbei für eine gute Asthma-Kontrolle, während weniger als 20 Punkte für ein nicht gut kontrolliertes Asthma sprechen [74].

2.8.2 ACQ6

Den „Asthma Control Questionnaire“ gibt es in unterschiedlichen Ausführungen mit variierender Fragenanzahl. Der für diese Arbeit verwendete Fragenkatalog ist der ACQ6 mit sechs Fragen. Der Fragebogen soll den Gesundheitszustand der Asthmapatienten innerhalb der letzten Woche messen. Ähnlich wie bei dem ACT werden typische Symptome wie nächtliches Erwachen durch Asthma, morgendliche Beschwerden, Einschränkungen im Alltag, Kurzatmigkeit, Pfeifen in der Brust sowie die Nutzung eines Notfallmedikamentes abgefragt. Jede Frage kann mit Antworten, welche 0-6 Punkten entsprechen, beantwortet werden. Insgesamt können bei dem ACQ6 also 0 bis maximal 36 Punkte erreicht werden. Anders als beim ACT korreliert beim ACQ6 eine geringe Punktezahl jedoch mit einem gut kontrollierten Asthma, und eine hohe Punktezahl mit einem schlecht kontrollierten Asthma [75].

2.8.3 SGRQ

Der „St. George`s Hospital Respiratory Questionnaire” ist ein krankheitsspezifischer Fragebogen für Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen. 1991 von P.W.

Jones + F.H. Quirk entwickelt und seit 1999 in deutscher Sprache verfügbar [76], misst er das Ausmaß der Beeinträchtigung gesundheitsbezogener Lebensqualität in Form einer Selbstbeurteilung. Der SGRQ besteht aus 50 Fragen (Items) welche in drei Subskalen eingeteilt werden: Krankheitssymptome, Aktivitäten sowie Belastung. Die Items sind eine Kombination aus Bewertungsfragen, welche mit 0 bis maximal 4 Punkten bewertet werden können, sowie dichotomen Richtig-Falsch-Fragen (Richtig = 1 Punkt, Falsch = 0 Punkte). Der Gesamtwert (Summenscore) bildet ein prozentuales Maß der Beeinträchtigung mit 0% als überhaupt nicht beeinträchtig bis 100% als vollständig beeinträchtigt. Somit gibt der Summenscore dem Untersucher eine Auskunft über das Ausmaß der durchschnittlichen Symptombelastung des Asthmapatienten [77].

2.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 20, IBM, Armonk, NY, USA) analysiert. Die meisten Parameter waren nicht normalverteilt. Somit erfolgte die Berechnung der Medianwerte (mit Minimum bis Maximum). Für den Vergleich der Patientengruppen mit kontinuierlichen Parametern, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test angewandt. Innerhalb einer Patientengruppe wurden Unterschiede zwischen den drei Zeitpunkten durch den Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben analysiert. In den Boxplots wird der Median dargestellt (Linie innerhalb der Box), der Interquartilsabstand (Höhe der Box) sowie die Extreme (vertikale Linien). Die Extreme sind definiert als alle Fälle, die < 1.5 Interquartilsabstände vom unteren Quartil nach unten bzw. vom oberen Quartil nach oben liegen. P-Werte von < 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientencharakteristika bei Studieneinschluss

Insgesamt wurden 20 Patienten mit schwerem Asthma sowie 20 gesunde Kontrollen in die Studie eingeschlossen. Die Kontrollen wurden aus dem Bekanntenkreis sowie Mitarbeitenden des Universitätsklinikums Rostock rekrutiert. Von den 20 Kontrollen waren 13 Teilnehmerinnen weiblich. Für die Rekrutierung der Benralizumab- und Dupilumab-Gruppen wurden Patienten aus der Asthma-Ambulanz des Universitätsklinikums Rostock ausgewählt, wo die Patienten in Hinsicht auf weitere mögliche Therapieoptionen vorstellig wurden. Den Patienten wurde, je nach Therapie-Entscheidung des behandelnden Arztes, entweder eine Benralizumab- oder eine Dupilumab-Therapie empfohlen. Nach Einwilligung zur Therapie konnten die Patienten zusätzlich - sofern den Ein- und Ausschlusskriterien entsprechend (**s. Abschnitt 2.1.2**) - in unsere Studie eingeschlossen werden. Die Patienten wurden entweder der Benralizumab-Gruppe (30 mg s.c. alle 4/8 Wochen) oder der Dupilumab-Gruppe (300 mg s.c. alle 2 Wochen) zugeordnet. Einverständniserklärungen lagen von allen Patienten vor. In der Benralizumab-Gruppe befanden sich 10 Patienten, 7 davon weiblich. Alle Patienten dieser Gruppe hatten ein Adult-Onset Asthma und erlitten vor Benralizumab-Therapiebeginn im Median 5 Asthma-Exazerbationen pro Jahr. Ein Patient hatte eine Allergie (Birke und Beifuß), welche sich bei Allergenkontakt als Hautreaktion äußerte. In der Benralizumab-Gruppe gab es somit keine Patienten mit Allergie-assoziierten respiratorischen Symptomen. In der Dupilumab-Gruppe wurden ebenfalls 10 Patienten rekrutiert, davon 6 weiblich. Sechs der Patienten hatten ein Adult-Onset Asthma. Es fand sich eine mediane Exazerbationsrate von 3x/Jahr vor Therapiebeginn. Drei der Patienten hatten Allergien (Patient 1: Birke, Gras, Tiere, Schimmel; Patient 2: Birke, Katze, Gras; Patient 3: Birke, Gras, Hausstaubmilben), welche sich alle bei Allergenexposition durch respiratorische Symptome äußerten. Dies suggeriert einen Zusammenhang zwischen den Allergien dieser Patienten und der Pathophysiologie ihres schweren Asthma. Es gab keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Alter zwischen der Kontrollgruppe und der Benralizumab- oder der Dupilumab-Gruppe, sowie zwischen der Benralizumab- und der Dupilumab-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag jedoch bei den Biomarkern vor: Die Benralizumab- als auch Dupilumab-Gruppe wies statistisch signifikant höhere Werte

des FeNO, der eosinophilen Granulozyten sowie des Gesamt-IgE auf. Im Vergleich zueinander, wies die Benralizumab-Gruppe eine signifikant höhere mediane Anzahl an eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut auf, als die Dupilumab-Gruppe. Die Dupilumab-Gruppe wiederum wies einen höheren numerischen medianen FeNO- sowie Gesamt-IgE-Wert als die Benralizumab-Gruppe auf, wenngleich keine Signifikanz vorlag (**s. Tab. 5b**).

3.2 Lungenfunktion und Asthma-Kontrolle

Um die Lungenfunktion darzustellen wurde in dieser Studie der FEV_1-Wert mittels Bodyplethysmographie bei der Kontrollgruppe zum Ausgangspunkt, sowie bei der Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, sowie nach 1 und 6 Monaten Therapie erhoben. Es zeigte sich zum Ausgangspunkt ein signifikant niedrigerer FEV_1-Wert bei den Patienten (Benralizumab- als auch Dupilumab-Gruppe) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Sowohl innerhalb der Benralizumab- sowie Dupilumab-Gruppe, als auch im Vergleich zueinander, zeigten sich über den 6-monatigen Verlauf der Therapie keine signifikanten Änderungen in dem FEV_1-Wert (**s. Tab. 5a**). Zusätzlich zu der Lungenfunktion wurde der Status der Asthma-Kontrolle mittels ACT-Fragebogen bei den Patienten der Benralizumab- sowie Dupilumab-Gruppe erhoben. Hier zeigte sich vor Therapiebeginn kein signifikanter Unterschied in der Asthma-Kontrolle zwischen den beiden Patientengruppen. Über den Verlauf der Therapie konnte jedoch in beiden Patientengruppen eine signifikante Verbesserung des Testergebnisses sowohl nach 1 Monat als auch 6 Monaten Therapie im Vergleich zu dem Ausgangswert festgestellt werden.

3.3 Biomarker

Die für diese Studie untersuchten Biomarker (FeNO, eosinophile Granulozyten im peripheren Blut, Gesamt-IgE), wurden bei den Kontrollen einmalig zum Ausgangszeitpunkt, sowie bei der Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe vor Therapiebeginn sowie nach 1- und 6-monatiger Therapie gemessen.

3.3.1 FeNO

Initial zeigte sowohl die Benralizumab- als auch die Dupilumab-Gruppe im Vergleich zu den gesunden Kontrollen einen signifikant höheren medianen FeNO-Wert auf. Im Vergleich der beiden Patientengruppen miteinander zeigte sich, dass die Dupilumab-Gruppe einen höheren numerischen medianen Wert als die Benralizumab-Gruppe aufwies, wenngleich keine statistische Signifikanz vorlag. Im Verlauf der Therapie zeigte der FeNO-Wert bei der Benralizumab-Gruppe keine signifikante Veränderung, während er in der Dupilumab-Gruppe nach 1 Monat Therapie, sowie nach 6 Monaten Therapie signifikant abfiel (**s. Tab. 5b**).

3.3.2 Eosinophile Granulozyten

Vor Therapiebeginn zeigte sich, dass beide Patientengruppen im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe signifikant höhere Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut aufwiesen. Zusätzlich ließ sich feststellen, dass dieser Parameter bei der Benralizumab-Gruppe signifikant höher als bei der Dupilumab-Gruppe war. Nach 1 Monat Therapie zeigte sich diese Zellreihe in der Benralizumab-Gruppe komplett depletiert. Dies blieb auch bis zum Zeitpunkt 6 Monate nach Therapiestart bestehen. In der Dupilumab-Gruppe zeigten sich nach Therapiestart keine signifikanten Veränderungen in Hinsicht auf die eosinophilen Granulozyten (**s. Tab. 5b**).

3.3.3 Gesamt-Immunglobulin E

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen wurden bei beiden Patientengruppen vor Therapiebeginn signifikant höhere Gesamt-IgE-Werte festgestellt. Es zeigte sich zusätzlich, dass die Dupilumab-Gruppe einen höheren numerischen Medianwert des Gesamt-IgE als die Benralizumab-Gruppe aufwies, wenngleich keine statistische Signifikanz vorlag. In der Dupilumab-Gruppe konnte nach 6-monatiger Therapie ein signifikant reduzierter Gesamt-IgE-Wert festgestellt werden, während in der Benralizumab-Gruppe kein Unterschied des Gesamt-IgE nach Behandlung festgestellt werden konnte (**s. Tab. 5b**).

	Alter bei Vorstellung [in Jahren]	**Alter bei Erst-manifestation** [in Jahren]	**FEV_1** [% Soll]	**ACT** [Punkte]
Kontrollen (n=20)	62 (30-78)	NA	107 (78-124)	NA
Benralizumab (n=10)				
Vor Therapiebeginn	63 (50-74)	42,5 (20-60)	61 (28-91)	11 (5-18)
1 Monat			65 (25-123)	17 (7-25) *
6 Monate			84 (24-124)	19 (12-25) *
Dupilumab (n=10)				
Vor Therapiebeginn	56 (30-73)	26 (3-65)	75 (46-86)	14 (10-23)
1 Monat			79 (46-99)	21 (14-25) *
6 Monate			76 (50-98)	23 (14-25) *

Tabelle 5a: Patientencharakteristika bei Studieneinschluss und während Biologika-Therapie
Gezeigt werden die Medianwerte (Minimum-Maximum) für Alter, FEV_1-Wert und ACT-Wert. Die Medianwerte wurden bei der Kontrollgruppe, der Benralizumab- und der Dupilumab-Gruppe vor Therapiebeginn, nach 1 Monat sowie nach 6 Monaten Therapie erhoben. ***** Signifikante Unterschiede ($p<0.05$) im Vergleich zum Ausgangswert. *Abkürzungen:* **FEV_1** Forciertes exspiratorisches Volumen in der 1. Sekunde der Ausatmung, **ACT** Asthma Control Test, **NA** Nicht anwendbar.

	FeNO [ppb]	**Eosinophile Zellen** [Zellen/µl]	**Gesamt-IgE** [U/ml]
Kontrollen (n=20)	18 (6-38)	105 (10-610)	24 (3-953)
Benralizumab (n=10)			
Vor Therapiebeginn	43 (29-146)	740 (400-1250)	81 (21-1005)
1 Monat	50 (21-108)	0 * (0-110)	NA
6 Monate	46 (20-92)	0 * (0-390)	92 (24-476)
Dupilumab (n=10)			
Vor Therapiebeginn	55 (5-170)	390 (220-690)	584 (34-2275)
1 Monat	13 * (5-39)	390 (150-810)	NA
6 Monate	17 * (5-37)	375 (140-660)	225 * (17-828)

Tabelle 5b: Patientencharakteristika bei Studieneinschluss und während Biologika-Therapie
Gezeigt werden die Medianwerte (Minimum-Maximum) für FeNO, eosinophile Zellen im peripheren Blut und IgE-Wert. Die Medianwerte wurden bei der Kontrollgruppe, der Benralizumab- und der Dupilumab-Gruppe vor Therapiebeginn, nach 1 Monat sowie nach 6 Monaten Therapie erhoben. * Signifikante Unterschiede ($p<0.05$) im Vergleich zum Ausgangswert. *Abkürzungen:* **FeNO** Fraktion des exhalierten Stickstoffmonoxids, **IgE** Immunglobulin E, **NA** Nicht anwendbar.

3.4 Anzahl der B-Zellen und TB-Zellen ($CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$) im Blut

Zusätzlich zu den Patientencharakteristika (**s. Tab. 5a, 5b**), stellten die B-Zellen sowie ihre Subpopulationen wichtige Parameter für diese Studie dar. Hierfür wurde der Kontrollgruppe einmalig Blut für eine Analyse abgenommen, während den zwei Biologika-Patientengruppen vor Therapiestart, nach 1 Monat sowie nach 6 Monaten Therapie jeweils Blut abgenommen wurde. Dies wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie (**s. Abschnitt 2.6**) analysiert. Es wurden die Gesamt-B-Zellzahl sowie die Population der TB-Zellen ($CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$) gemessen.

3.4.1 Gesamt-B-Zellzahlen

Vor Therapiestart zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Gesamt-B-Zellzahl zwischen der Kontrollgruppe und der Benralizumab- oder Dupilumab-Gruppe, sowie zwischen den beiden Patientengruppen, welche ein Biologikum erhielten (**s. Abb. 13**). Dies blieb über den gesamten Therapieverlauf mit Benralizumab bzw. Dupilumab hinweg unverändert (**s. Tab. 6a, 6c**).

3.4.2 Transitionale B-Zellen (TB-Zellen)

Zum Zeitpunkt der ersten Messung konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollen und der Benralizumab-Gruppe in Hinsicht auf die TB-Zellpopulation festgestellt werden. Es war jedoch ein Trend zu weniger TB-Zellen bei der Dupilumab-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen als auch der Benralizumab-Gruppe zu vermerken (**s. Abb. 14, Tab. 6a und 6c**). Im peripheren Blut der Benralizumab-Patienten ließ sich nach einem Monat Therapie ein temporärer, signifikanter Anstieg der TB-Zellen nachweisen, welcher jedoch nach 6 Monaten nicht mehr zu vermerken war (**s. Abb. 15, Tab. 6a und 6c**). Bei den Patienten der Dupilumab-Gruppe zeigte sich nach 6 Monaten Therapie ein signifikanter Anstieg der TB-Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 1 Monat Therapie (**s. Abb. 16, Tab. 6a und 6c**).

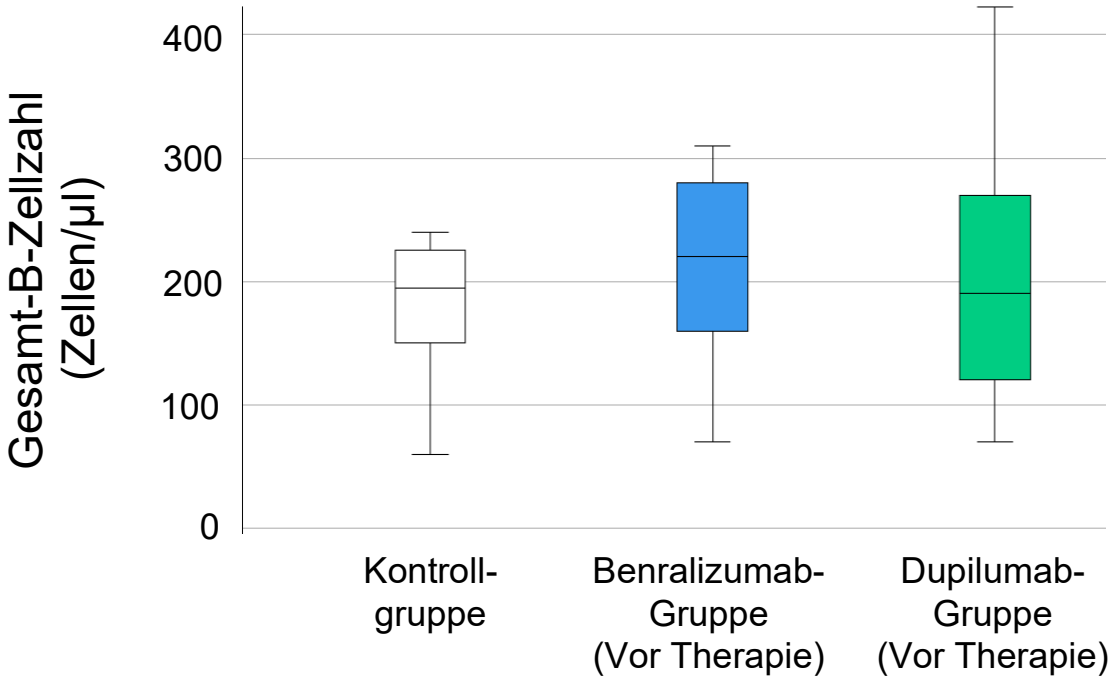


Abbildung 13: Boxplot-Darstellung der Gesamt-B-Zellzahl vor Biologika-Therapie
Abgebildet sind die Konzentrationen der gesamten B-Zellen der Kontroll-, Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe vor Therapie. Die Boxplots zeigen den Medianwert (Linie innerhalb der Box), den Interquartilsabstand (Höhe der Box) sowie die Extreme (vertikale Linien). Weißer Boxplot: Kontrollen, blauer Boxplot: Benralizumab-Gruppe, grüner Boxplot: Dupilumab-Gruppe. *Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen oder Zeitpunkten ($p<0.05$).

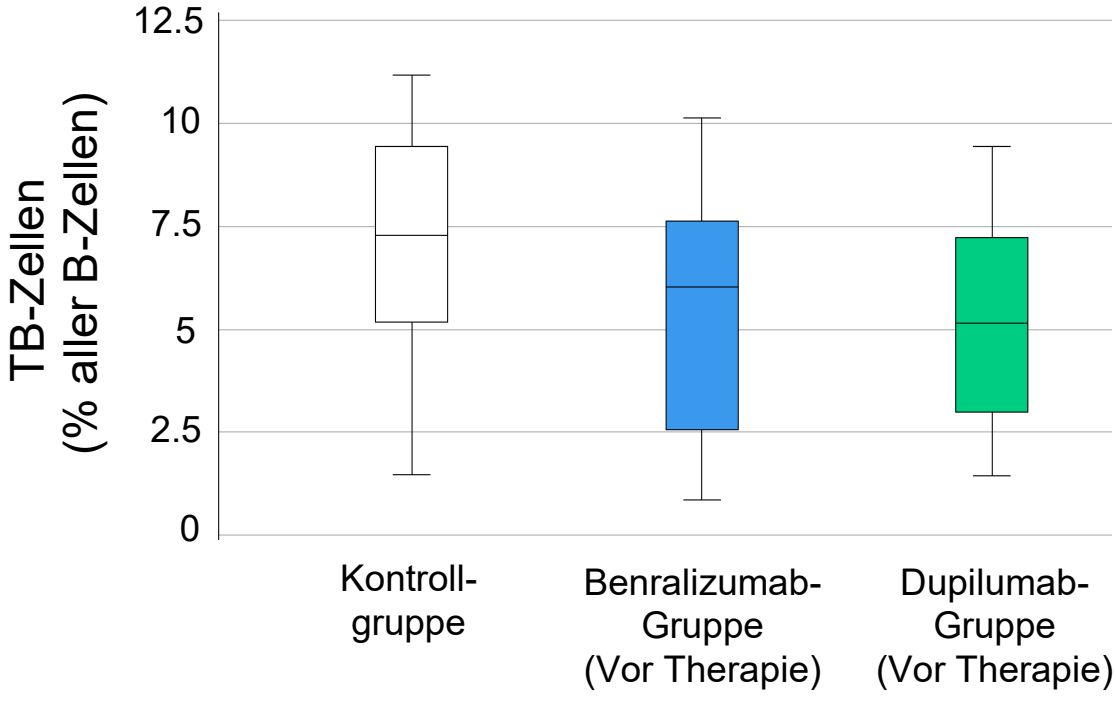


Abbildung 14: Boxplot-Darstellung der TB-Zellpopulation vor Biologika-Therapie
Abgebildet ist der prozentuale Anteil der TB-Zellen an der Gesamt-B-Zellzahl der Kontroll-, Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe vor Therapie. Die Boxplots zeigen den Medianwert (Linie innerhalb der Box), den Interquartilsabstand (Höhe der Box) sowie die Extreme (vertikale Linien). Weiße Boxplots: Kontrollen, blaue Boxplots: Benralizumab-Gruppe, grüne Boxplots: Dupilumab-Gruppe. *Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen oder Zeitpunkten ($p<0.05$). *Abkürzungen:* **TB** Transitionale B-Zellen.

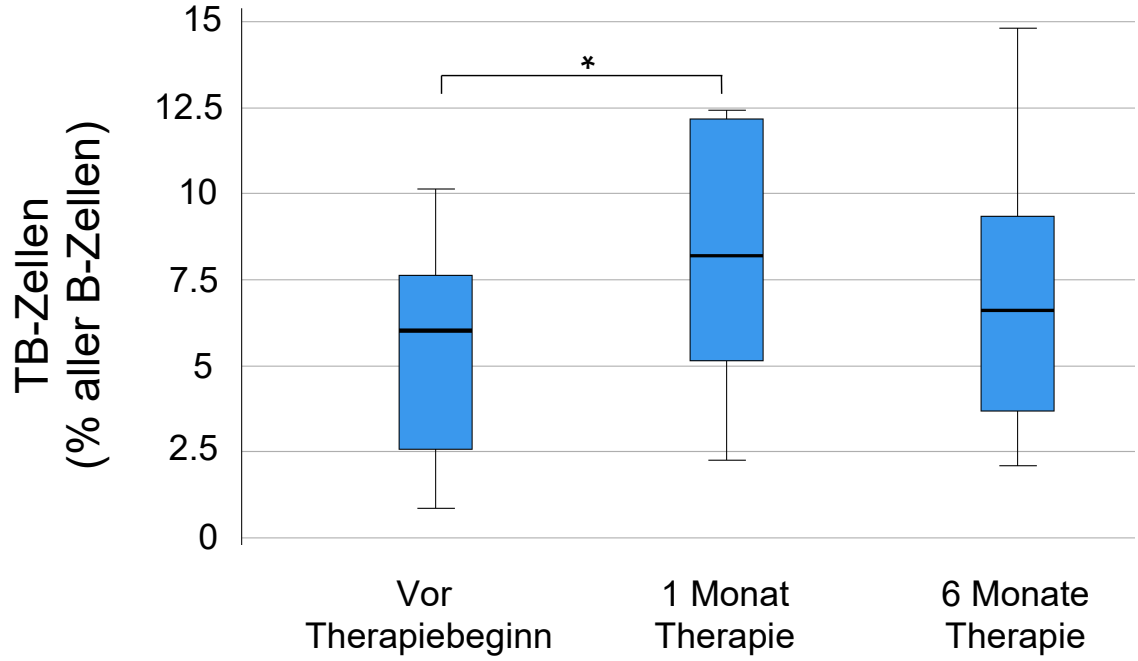


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der TB-Zellpopulation während Benralizumab-Therapie
Abgebildet ist der prozentuale Anteil der TB-Zellen an der Gesamt-B-Zellzahl vor und während Benralizumab-Therapie. Die Boxplots zeigen den Medianwert (Linie innerhalb der Box), den Interquartilsabstand (Höhe der Box) sowie die Extreme (vertikale Linien). Blaue Boxplots: Benralizumab-Gruppe. *Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen oder Zeitpunkten ($p<0.05$). *Abkürzungen:* **TB** Transitionale B-Zellen.

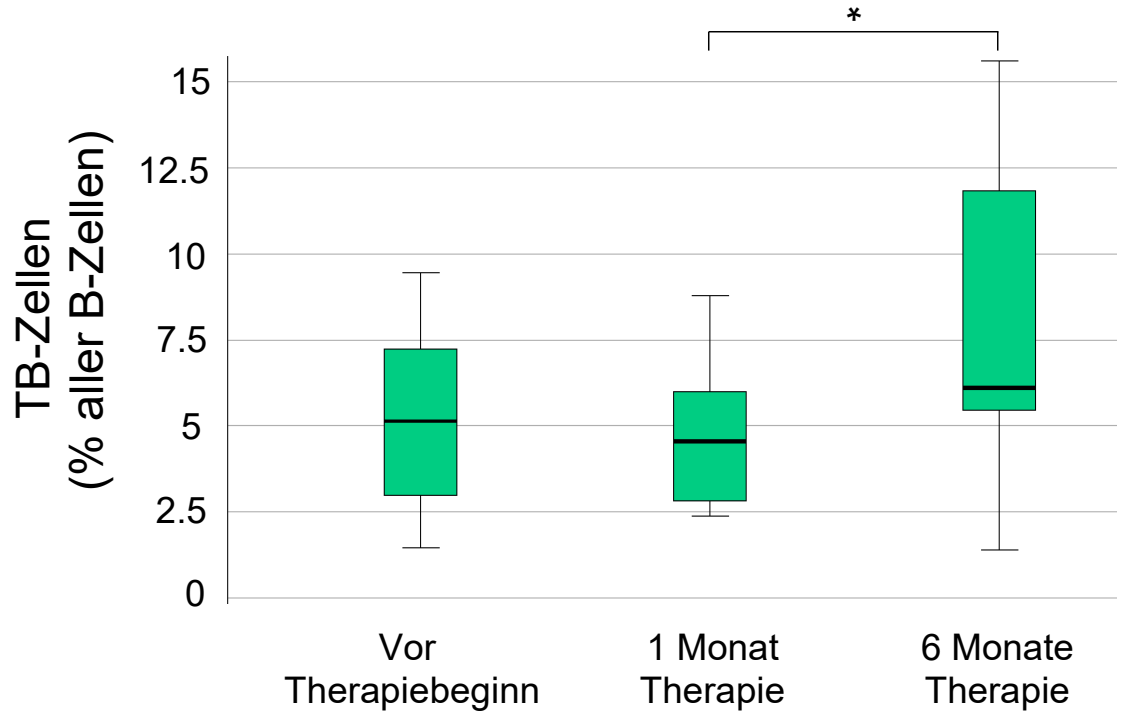


Abbildung 16: Boxplot-Darstellung der TB-Zellpopulation während Dupilumab-Therapie
Abgebildet ist der prozentuale Anteil der TB-Zellen an der Gesamt-B-Zellzahl vor und während Dupilumab-Therapie. Die Boxplots zeigen den Medianwert (Linie innerhalb der Box), den Interquartilsabstand (Höhe der Box) sowie die Extreme (vertikale Linien). Grüne Boxplots: Dupilumab-Gruppe. *Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen oder Zeitpunkten ($p<0.05$). *Abkürzungen:* **TB** Transitionale B-Zellen.

3.5 Weitere B-Zell-Populationen im peripheren Blut

Im Rahmen der für diese Studie wichtigen, detaillierten Betrachtung der B-Zell-Subpopulationen wurden in der Durchflusszytometrie zusätzlich zu den in Abschnitt 3.4 erläuterten Gesamt-B-Zellzahlen sowie TB-Zellzahlen, weitere B-Zell-Subpopulationen bestimmt. Hierzu gehören die $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen, Naive B-Zellen ($CD19^{+}CD27^{-}IgD^{+}$), Non-Switched Memory B-Zellen ($CD19^{+}IgD^{+}CD27^{+}$), Switched Memory B-Zellen ($CD19^{+}IgD^{-}CD27^{+}$) sowie die Plasmablasten ($CD19^{+}CD27^{+}CD38^{++}$). Auch hier erfolgte eine einmalige Messung dieser Populationen im peripheren Blut der Kontrollen, sowie drei Messungen in den Benralizumab- sowie Dupilumab-Patientengruppen (vor Therapiestart, nach 1 Monat Therapie, nach 6 Monaten Therapie).

3.5.1 $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen

Die $CD19^{+}CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen zeigten keinen Unterschied in ihrer Anzahl zwischen der Kontrollgruppe und der Benralizumab- oder der Dupilumab-Gruppe, bzw. zwischen den beiden Biologika-Patientengruppen vor Initiation der Therapie. Auch unter der Biologika-Therapie blieb ein signifikanter Anstieg oder Abfall dieser Zellzahlen aus, sowohl nach 1 Monat als auch 6 Monaten Therapie (**s. Tab. 6a und 6c**).

3.5.2 Naive B-Zellen

Bei der Anzahl der Naiven B-Zellen ($CD19^{+}CD27^{-}IgD^{+}$) ließen sich vor Therapiestart keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Kontroll-, Benralizumab-, Dupilumab-Gruppe) feststellen. Auch während der Biologika-Therapie blieben signifikante Änderungen dieser Zellzahlen bei der Benralizumab- sowie Dupilumab-Patientengruppe aus (**s. Abb. 6b und 6d**).

3.5.3 Non-Switched Memory B-Zellen

Die Anzahl der Non-Switched Memory B-Zellen der Kontrollgruppe (Oberflächenproteine: CD19, IgD und CD27) unterschied sich vor Therapiebeginn nicht der Benralizumab-Gruppe oder der Dupilumab-Gruppe bzw. zwischen der Benralizumab- und der Dupilumab-Gruppe. Dieser Sachverhalt blieb auch nach 1 Monat sowie nach 6 Monaten Biologika-Therapie bestehen (**s. Abb. 6b und 6d**).

3.5.4 Switched Memory B-Zellen

Die $CD19^{+}IgD^{-}CD27^{+}$-Switched Memory B-Zellen zeigten vor Therapiebeginn keinen signifikanten Unterschied in ihrer Anzahl zwischen den drei Patientengruppen (Kontrollgruppe, Benralizumab-Gruppe, Dupilumab-Gruppe). Es zeigte sich auch während der Therapie keine signifikante Veränderung der Zellzahlen, weder innerhalb einer Patientengruppe noch im Vergleich der zwei Biologika-Gruppen zueinander (**s. Tab. 6b und 6d**).

3.5.5 Plasmablasten

Die Subgruppe der Plasmablasten ($CD19^{+}CD27^{+}CD38^{++}$) wurde ebenfalls untersucht. Vor Therapiebeginn zeigte sich eine niedrige Anzahl an Plasmablasten im Blut, sowohl bei der Kontrollgruppe (Median: 2 Zellen/µl) als auch bei den Patientengruppen (Median Benralizumab-Gruppe: 3 Zellen/µl, Median Dupilumab-Gruppe: 4 Zellen/µl). Während der Biologika-Therapie fielen die Zellzahlen weiterhin gering aus: Die Benralizumab-Gruppe wies nach 1 Monat Therapie einen medianen Wert von 1,5 Zellen/µl auf. Nach 6 Monaten Therapie ließen sich 2,6 Zellen/µl im Median auswerten. Bei der Dupilumab-Gruppe konnte nach 1 Monat Therapie ein medianer Wert von 2,5 Zellen/µl bestimmt werden, sowie nach 6 Monaten ein Median von 2,2 Zellen/µl. Aufgrund der sehr niedrigen Zellzahlen der Plasmablasten konnten keine validen Aussagen zu dieser Population getroffen werden. Dies betraf zum einen den Vergleich der Zellzahlen vor Therapiebeginn zwischen den drei untersuchten Gruppen (Kontrollgruppe, Benralizumab- sowie Dupilumab-Gruppe). Zum anderen konnten keine wissenschaftlich validen Aussagen zu dem Populationsverhalten der Plasmablasten unter Biologika-Therapie getroffen werden.

B-Zell-Population	Gesamt-B-Zellen	Transitionale B-Zellen	CD24++ CD27+-Zellen
Marker	**CD19+**	**CD19+ CD24++ CD38++**	**CD19+ CD24++ CD27+**
	% aller Leukozyten	% aller B-Zellen	% aller B-Zellen
Kontrollen	3.2 (1.2 - 8.4)	7.3 (1.5 - 23.5)	23.3 (9.5 -58.8)
Benralizumab-Gruppe			
Vor Therapie	2.5 (0.9 - 4.2)	6.0 (0.9 - 17.8)	23.6 (9.7 - 45.3)
1 Monat Therapie	2.6 (1.4 - 4.8)	8.2 (2.3 - 22.9)	24.2 (9.7 - 48.7)
6 Monate Therapie	2.1 (1.1 - 5.2)	6.6 (2.1 - 14.8)	24.9 (14.6 - 25.2)
Dupilumab-Gruppe			
Vor Therapie	2.4 (1.1 - 6.4)	5.1 (1.5 - 9.5)	22.5 (10.3 - 39.2)
1 Monat Therapie	2.5 (1.3 - 7.4)	4.6 (2.4 - 8.8)	21.9 (8.8 -36.1)
6 Monate Therapie	3.2 (1.1 - 6.2)	6.1 (1.4 - 15.6) *	20.8 (9.1 - 35.6)

Tabelle 6a: Prozentzahlen von B-Zell-Populationen vor Therapie und unter Benralizumab-/Dupilumab-Therapie
Prozentangaben der Gesamt-B-Zellen, Transitionalen B-Zellen sowie $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen im peripheren Patientenblut. Gezeigt sind die Medianwerte (Minimum-Maximum). *$p < 0.05$ im Vergleich zum Zeitpunkt nach 1 Monat Therapie.

B-Zell-Population	Naive B-Zellen	Non-Switched Memory B-Zellen	Switched Memory B-Zellen
Marker	**CD19+ CD27- IgD+**	**CD19+ IgD+ CD27+**	**CD19+ IgD- CD27+**
	% aller B-Zellen	% aller B-Zellen	% aller B-Zellen
Kontrollen	68.6 (30.1 - 82.2)	15.5 (4.3 - 44.4)	13.7 (6.2 - 27.5)
Benralizumab-Gruppe			
Vor Therapie	67.0 (31.0 - 79.0)	10.8 (2.6 - 35.0)	18.8 (11.2 -29.8)
1 Monat Therapie	68.0 (33.0 - 79.7)	12.1 (2.7 - 27.3)	17.2 (2.1 - 33.9)
6 Monate Therapie	61.1 (29.2 - 78.4)	11.6 (3.0 -45.1)	17.8 (13.2 - 30.1)
Dupilumab-Gruppe			
Vor Therapie	67.8 (46.8 - 83.8)	8.8 (3,7 - 34.2)	15.7 (7.7 - 39.0)
1 Monat Therapie	70.5 (49.2 - 86.5)	10.1 (2.9 - 27.5)	14.1 (5.2 - 34.2)
6 Monate Therapie	71.0 (33.8 - 86.7)	9.9 (1.7 -15.9)	14.8 (5.2 - 42.3)

Tabelle 6b: Prozentzahlen von B-Zell-Populationen vor Therapie und unter Benralizumab-/ Dupilumab-Therapie
Prozentangaben der naiven B-Zellen sowie B-Zell-Subpopulationen (Non-Switched Memory B-Zellen, sowie Switched Memory B-Zellen) im peripheren Patientenblut. Gezeigt sind die Medianwerte (Minimum-Maximum).

B-Zell-Population	Gesamt-B-Zellen	Transitionale B-Zellen	CD24++ CD27+-Zellen
Marker	**CD19+**	**CD19+ CD24++ CD38++**	**CD19+ CD24++ CD27+**
	Zellen/µl Blut	Zellen/µl Blut	Zellen/µl Blut
Kontrollen	195 (60 - 490)	12 (3 - 89)	41 (19 - 119)
Benralizumab-Gruppe			
Vor Therapie	220 (70 - 310)	13 (1 - 32)	52 (19 - 81)
1 Monat Therapie	215 (90 - 320)	17 (2 - 30)	47 (19 - 76)
6 Monate Therapie	165 (70 - 280)	12 (2 - 31)	37 (19 - 69)
Dupilumab-Gruppe			
Vor Therapie	190 (70 - 660)	8 (3 - 28)	45 (16 - 201)
1 Monat Therapie	185 (80 - 570)	7 (4 - 32)	35 (12 - 84)
6 Monate Therapie	195 (80 - 440)	11 (3 - 50) *	31 (11 - 87)

Tabelle 6c: Zellkonzentrationen von B-Zell-Populationen vor Therapie und unter Benralizumab-/ Dupilumab-Therapie
Absolute Zellzahlen der Gesamt-B-Zellen, Transitionalen B-Zellen sowie $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen im peripheren Patientenblut. Gezeigt sind die Medianwerte (Minimum-Maximum). *$p < 0.05$ im Vergleich zum Zeitpunkt nach 1 Monat Therapie.

B-Zell-Population	Naive B-Zellen	Non-Switched Memory B-Zellen	Switched Memory B-Zellen
Marker	**CD19+ CD27- IgD+**	**CD19+ IgD+ CD27+**	**CD19+ IgD- CD27+**
	Zellen/µl Blut	Zellen/µl Blut	Zellen/µl Blut
Kontrollen	130 (28 - 353)	28 (10 - 85)	26 (12 - 58)
Benralizumab-Gruppe			
Vor Therapie	154 (23 - 210)	26 (5 - 46)	37 (19 - 72)
1 Monat Therapie	149 (34 - 228)	25 (5 - 57)	31 (17 - 64)
6 Monate Therapie	126 (21 - 197)	22 (5 - 49)	33 (13 - 56)
Dupilumab-Gruppe			
Vor Therapie	95 (45 - 415)	19 (5 - 140)	29 (11 - 96)
1 Monat Therapie	114 (54 - 456)	20 (3 - 58)	24 (11 - 68)
6 Monate Therapie	119 (40 - 339)	14 (2 - 66)	21 (13- 76)

Tabelle 6d: Zellkonzentrationen von B-Zell-Populationen vor Therapie und unter Benralizumab-/ Dupilumab-Therapie
Absolute Zellzahlen der Naiven B-Zellen sowie B-Zell-Subpopulationen (Non-Switched Memory B-Zellen sowie Switched Memory B-Zellen) im peripheren Patientenblut. Gezeigt sind die Medianwerte (Minimum-Maximum).

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde erstmals bei Patienten mit schwerem Asthma die Wirkung der Biologika Benralizumab und Dupilumab auf Transitionale B-Zellen, eine Subgruppe der regulatorischen B-Zellen, untersucht. Wir haben erstmalig gezeigt, dass bei einer Dupilumab-Therapie die Anzahl der TB-Zellen, welche anteilig zu den Bregs gehören, steigt. Das könnte bedeuten, dass es durch die Dupilumab-Therapie zu einer Vermehrung der TB-Zellen kommt, welche regulatorische Effekte in der Immunantwort haben. Diese neue Erkenntnis hat eine große Bedeutung für die Asthmaforschung sowie für das Verständnis der Wirkmechanismen des Biologikums Dupilumab auf das menschliche Immunsystem.

Die ersten Studien zu der Rolle der Bregs und ihren Subpopulationen bei Asthma erfolgten mittels einer allergeninduzierten Typ-2-Inflammation im Mausmodell. Die Ergebnisse brachten Erkenntnisse zu den immunregulatorischen Funktionen der Bregs, insbesondere der IL-10-produzierenden B-Zellen [54]. Braza et al. zeigten, dass bei Mäusen mit einer induzierten allergischen Atemwegsentzündung, die $CD9^+$-B-Zell-Subpopulation durch ihre IL-10-Produktion zu einer Reduktion der Atemwegsentzündung beigetragen hat [78]. In der Studie von Gao et al. zu ihrem Mausmodell mit allergischem Asthma und einer induzierten parasitären Infektion konnte die immunregulatorische und protektive Rolle der $IL\text{-}10^+$-Bregs bestätigt werden [79]. Amu et al., Singh et al. und Lundy et. al zeigten, dass bei Breg-defizienten Mäusen mit einer allergischen Atemwegserkrankung höhere Level an IgE, Typ-2-Zytokinen (IL-4, IL-5) sowie eosinophilen Granulozyten zu verzeichnen waren. Zusätzlich postulierten sie, dass durch den adoptiven Zelltransfer von Bregs die Inflammation anteilig rückgängig war [80-82]. Diese These bestätigten Habener et al. in ihrer Studie [83].

Trotz der Relevanz dieser Ergebnisse für das Verständnis der Rolle von Bregs im Asthma, sind für den klinischen Alltag humane Daten von großer Bedeutung, da Mausmodelle nur begrenzt aussagefähig für humanes Asthma sind [84].

So zeigten Miyajima et al. 2020, dass Patienten mit allergischem Asthma eine kleinere IL-10-produzierende regulatorische B-Zellpopulation ($CD3^-CD19^+CD24^{++}CD27^+$-

Zellen) als die Kontrollen aufwiesen [64]. Van der Vlugt et al. beschäftigten sich ebenfalls mit $CD24^{++}CD27^{+}$-B-Zellen, bei Patienten mit allergischem Asthma in milder-moderater Ausprägung. Sie stellten konträr zu Miyajima et al. fest, dass es keine Unterschiede in der Zellanzahl zwischen den Patienten und den Kontrollen gab [67], was von Wiest et al. ebenfalls gezeigt werden konnte [68]. Van der Vlugt et al. beschrieben zusätzlich, dass kultivierte $CD24^{++}CD27^{+}$-Bregs der Patienten auf Stimulation hin weniger IL-10 im Vergleich zu den Kontrollen produzierten. Die Autoren nehmen somit an, dass die $CD24^{++}CD27^{+}$-Bregs bei Patienten mit allergischem Asthma eine beeinträchtigte regulatorische Aktivität besitzen [67]. Wiest et al. beschäftigten sich in ihrer Studie zu regulatorischen B-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit allergischem Asthma zusätzlich zu den $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen, mit der Anzahl und Funktion (IL-10-Produktion) von TB- sowie B1-Zellen vor und während einer OCS-Therapie. Die Anzahl der TB-Zellen (von den Autoren als $CD24^{++}CD38^{++}$-Zellen definiert) unterschied sich vor OCS-Therapie nicht von den Kontrollen. Zudem reduzierte die OCS-Therapie die IL-10-Expression aller drei untersuchten Breg-Subpopulationen [68]. Wirz et al. beschäftigten sich in ihrer Studie zum Vergleich zwischen regulatorischen B-Zellen bei Asthma und allergischer Rhinitis mit der Subpopulation der $CD19^{+}IL\text{-}10^{+}CD24^{+}CD38^{+}$-Zellen, welche einen ähnlichen Phänotyp wie die von Wiest et al. als TB-Zellen beschriebenen Zellen haben. Hier wurde jedoch zusätzlich die IL-10-Produktion mittels Zellkultur gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass keine Abweichungen in der Anzahl von Bregs zwischen Patienten mit Asthma und gesunden Kontrollen ersichtlich waren. Es ist anzumerken, dass bei dieser Studie die Patienten 14-15 Jahre alt waren und auch hier größtenteils keine schwere Asthmaform vorlag [69]. Mit schwerem Asthma beschäftigten sich jedoch Brosseau et al. in ihrer Studie zu Bregs bei Patienten mit schwerem Asthma. Es wurden $CD9^{+}$-B-Zellen, welche laut Mausmodellen als Marker für IL-10-kompetente Bregs gelten, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl der $CD9^{+}$-B-Zellen bei Patienten mit schwerem Asthma verringert war [66]. Die einzig in der Literatur bereits vorliegende Arbeit zu regulatorischen B-Zellen, schwerem Asthma, sowie Biologika, stellt die 2021 veröffentlichte Studie von Bergantini et al. dar. Hier wurden Bregs mit den Markern $CD19^{+}CD24^{++}CD27^{+}$ bei Patienten mit schwerem allergischen Asthma vor und während Omalizumab-Therapie gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine geringere Anzahl an $CD24^{++}CD27^{+}$-B-Zellen bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen

vor Therapiebeginn. Unter Omalizumab-Therapie stiegen jedoch die Zellzahlen und glichen sich denen der Kontrollen an [65].

Zusammenfassend untersuchten diese humanen Studien die Quantität verschiedener Breg-Subgruppen bei Patienten mit allergischem Asthma im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Ergebnisse zeigen ein gemischtes Bild, welches eine Heterogenität der Patienten nahelegt: Ein Teil der Patienten scheinen eine geringere Anzahl an TB-Zellen aufzuweisen, während andere Patienten keine Unterschiede in der TB-Zellanzahl zeigen. Passend zu diesem heterogenen Bild in der Literatur, zeigten sich in unserer Studie ebenfalls keine klaren Unterschiede in den TB-Populationen. Es konnte lediglich ein Trend zu einer verminderten TB-Zellzahl bei der Dupilumab-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe ausgemacht werden. In den genannten Studien wurde zusätzlich postuliert, dass die Bregs von Patienten mit Asthma eine beeinträchtigte regulatorische Aktivität im Sinne einer verminderten IL-10-Produktion vorweisen. Therapien mit OCS oder Omalizumab haben in den Studien Effekte auf die Anzahl sowie Funktion der Bregs gezeigt. Es wird von mehreren Autoren zusätzlich betont, dass das Verständnis der Rolle der regulatorischen B-Zellen im humanen Asthma jedoch noch am Anfang steht [66,85].

Zur Regulation der Bregs bei erwachsenen Patienten mit schwerem Asthma und bei Patienten mit intrinsischem Asthma, sowie zum Einfluss der neueren Biologika, wie z.B. Anti-IL-4/-IL-13-Antikörpern oder Anti-IL-5(-R)-Antikörpern, lagen bislang jedoch keine Daten vor.

4.1 Methodologische Stärken der Studie

4.1.1 Elaborierte Analyse der B-Zellen mittels moderner Durchflusszytometrie

Eine Stärke dieser Arbeit stellt die Methode der Analyse der B-Zellen mittels Durchflusszytometrie dar. Die Durchflusszytometrie ist ein lang bewährtes Verfahren, welches über die letzten Jahrzehnte hinweg stets weiterentwickelt wurde und somit in immer mehr Bereichen zur Analyse von Materialien angewandt wird. Hierzu gehören unter anderem die Felder der Immunologie, Molekularbiologie, Bakteriologie sowie Virologie[86]. Zusätzlich ist die Durchflusszytometrie eine in unserem Labor sehr gut

etablierte Methode. Durch das Verwenden der Durchflusszytometrie haben wir somit ein etabliertes Messverfahren ausgewählt, welches einen essentiellen Teil zu der präzisen Erhebung unserer Ergebnisse beigetragen hat.

4.1.2 Untersuchung von Patienten mit schwerem Asthma im realen Leben

Eine weitere Stärke dieser Arbeit ist das Studiendesign. Es handelt sich um eine klinisch-experimentelle Studie, bei welcher reale Patienten mit einer schweren Asthma-Erkrankung rekrutiert wurden. Da humane Zellen in der Durchflusszytometrie untersucht worden sind, und es sich nicht um ein artifizielles Mausmodell handelt, lassen sich realitätsnahe Rückschlüsse auf die Wirkung der Biologika auf das humane Immunsystem ziehen. Diese Studie hebt sich somit durch die Verwendung humaner Zellen von Patienten mit schwerem Asthma unter Einfluss neuer Biologika stark von bisherigen Studien ab und liefert einen wichtigen Beitrag zu neuen Erkenntnissen in der Asthma-Forschung.

4.1.3 Präzise Charakterisierung der Patientengruppen

Die Patienten dieser Studie wurden in der von Professor Dr. M. Lommatzsch geleiteten Asthma-Ambulanz der Universitätsmedizin Rostock rekrutiert. Die Ambulanz verfügt über ein breites Spektrum an Therapieangeboten für Patienten mit schwerem Asthma. Die Asthma-Ambulanz von Prof. Lommatzsch hat große Erfahrung in der Charakterisierung und Therapie von Patienten mit einem schweren, schlecht kontrollierbaren Asthma. Im Jahr 2021 publizierten Prof. Lommatzsch et. al. die Studie „Type 2 biomarker expression (FeNO and blood eosinophils) is higher in severe adult-onset than in severe early-onset asthma“ in der Zeitschrift Allergy. Hierfür wurden 220 Patienten mit einem schweren Asthma vor Einleitung einer Biologika-Therapie in der Asthma-Ambulanz untersucht. Die Arbeitsgruppe charakterisierte das Asthma der Studienteilnehmer und analysierte unter anderem die Biomarker FeNO sowie eosinophile Granulozyten mit dem Ergebnis, dass beide Biomarker höhere Spiegel bei Patienten mit einem Adult-onset Asthma, als bei einem Early-onset Asthma, aufwiesen [87]. Die Asthma-Ambulanz hat somit Erfahrung im Umgang sowie im Rekrutieren von Patienten mit schwerem Asthma als auch im Charakterisieren des Asthma. In der vorliegenden Studie wurde auf diese Erfahrung zurückgegriffen und auch bei unserer Studienpopulation wurde das schwere Asthma sehr gut definiert, u.a. das Erstauftreten

der Erkrankung (und somit Einteilung in ein Early-onset Asthma bzw. Adult-onset Asthma), Anzahl der Asthma Exazerbationen pro Jahr und das Vorliegen klinisch relevanter Allergien. Zusätzliche Basischarakteristika wie Alter und Geschlecht wurden ebenfalls bestimmt. Ebenso wurde die Asthma-Kontrolle mittels ACT-Fragebogen und Lungenfunktionswerten (FEV_1), sowie Biomarker, welche auf eine Typ-2-Inflammation hinweisen (FeNO, eosinophile Granulozyten im peripheren Blut, Gesamt-IgE) erhoben. Aufgrund der detaillierten Charakterisierung der Studienpopulation konnten Risiken für zufällige Ergebnisse reduziert und somit präzisere Studienergebnisse erzielt werden.

4.2 Methodologische Schwächen der Studie

4.2.1 Unterschiedliche Patientenpopulationen in der Dupilumab- und Benralizumab-Gruppe

Eine Schwäche dieser Studie betrifft die Unterschiede zwischen der Benralizumab- und Dupilumab-Patientengruppe. Dem zuständigen Arzt war es – wie es auch realitätsgetreu im klinischen Alltag stattfindet – freigestellt, nach seinem Ermessen den Patienten das zu ihrem Asthma passendste Biologikum zu verschreiben und sie somit entweder der Benralizumab- oder der Dupilumab-Gruppe zuzuteilen. Bei der Therapie mit dem Biologikum Benralizumab ist es bekannt, dass eine Depletion der eosinophilen Granulozyten erfolgt [44]. Bei Dupilumab ist es bekannt, dass das FeNO im Verlaufe der Therapie sinkt [88]. Die Biomarker „Eosinophile Granulozyten“ (bei Benralizumab-Therapie) und „FeNO“(bei Dupilumab-Therapie) stellen Prädiktoren für das Ansprechen der Patienten auf das jeweilige Biologikum dar [12]. Zudem wird bei sehr hohen Bluteosinophilen-Zahlen auf den Einsatz von Dupilumab (aufgrund der Gefahr einer Hypereosinophilie unter Dupilumab-Therapie) oft verzichtet [89]. Aufgrund dessen wurden Patienten mit höheren Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten der Benralizumab-Gruppe und Patienten mit höheren FeNO-Werten der Dupilumab-Gruppe zugeteilt, wodurch signifikante Unterschiede der Biomarker zwischen den Patientengruppen entstanden. Zusätzlich schlussfolgern wir, dass sich in der Dupilumab-Gruppe aufgrund der höheren Gesamt-IgE-Werte mehr Patienten mit einem allergischen, extrinsischen Asthma befanden, als in der Benralizumab-Gruppe. Diese unterschiedliche Ausgangssituation der Studienpopulationen erschwerte den Vergleich der Patientengruppen.

4.2.2 Niedrige Fallzahlen in der Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe

Für die vorliegende Studie wurden 2x10 Patienten sowie 20 Kontrollen rekrutiert und untersucht. Die kleine Fallzahl unserer Arbeit lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass die Studie an lediglich einem Zentrum durchgeführt wurde und es sich zusätzlich um eine rare Patientenpopulation handelt. Zum anderen wurde diese Studie im Sinne einer Pilotstudie durchgeführt, zum Erstellen einer Hypothese bezüglich der Effekte der Biologika auf regulatorische B-Zellen. Dies ist gelungen und somit schließt sich als nächster Schritt, zur Überprüfung dieser neu aufgestellten Hypothese, die Durchführung größer angelegter Studien an.

4.2.3 Fehlende funktionelle Charakterisierung der TB-Zellen

Eine weitere Schwäche der vorliegenden Arbeit stellt der Sachverhalt dar, dass die untersuchten B-Zell-Subpopulationen nicht funktionell untersucht wurden. Somit lässt sich nicht sicher sagen, wieviel Prozent dieser Subpopulationen tatsächlich zu den regulatorischen B-Zellen gehören. „Bregs“ ist ein Sammelbegriff für immunmodulierende B-Zellen. Häufig kommen diese Zellen bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen vor und exprimieren IL-10 [90]. Obwohl es bislang keinen klaren Konsens für die Klassifikation bzw. Definition regulatorischer B-Zellen gibt, definieren Autoren sie häufig über ihre immunmodulierenden Eigenschaften. Diese begründen sich in der Expression von antiinflammatorischen Zytokinen. Einige Bregs exprimieren IL-35, TGF-β oder Granzym B, und wirken über die jeweiligen Mechanismen regulierend im Immunsystem. Das von Bregs jedoch am häufigsten exprimierte und in der Literatur in diesem Kontext am besten untersuchte Zytokin ist das IL-10. Bei 6 von 8 humanen Breg-Subpopulationen stellt das IL-10 das definierende Zytokin dar [54]. Zu diesen 6 Subpopulationen, bei welchen eine IL-10-Produktion bekannt ist, gehören auch die von uns gemessenen B-Zell-Subpopulationen der $CD24^{++}CD27^{+}$-Zellen, TB-Zellen ($CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$) sowie die Plasmablasten ($CD19+CD27^{+}CD38^{++}$) [54,90]. Es hätte in dieser Studie also zusätzlich zu den gemessenen Oberflächenmarkern der B-Zell-Subpopulationen die IL-10-Produktion als Breg-Indikator gemessen werden müssen. Hierfür hätten die Zellen vor der Durchflusszytometrie für 72h mit einem Stimulationsmedium (z.B.: CpG-ODN) kultiviert werden müssen. Anschließend hätte man die Zellen für die FACS vorbereiten (u.a. färben) müssen. Daraufhin hätte es in der Durchflusszytometrie nach dem „$CD19^{+}$-Gate“ ein zusätzliches Gate für „$CD19^{+}IL\text{-}10^{+}$“ geben müssen. Somit

wäre sichergestellt gewesen, dass alle ausgewerteten B-Zell-Subpopulationen auch tatsächlich IL-10-produzierende Zellen und somit Bregs sind. Dies sollte in kommenden Studien mit in die Planung aufgenommen werden.

4.2.4 Fehlende Erfassung der potentiell veränderten Begleittherapie unter Benralizumab- und Dupilumab-Therapie

Bevor die Patienten in unsere Studie eingeschlossen wurden, erfolgte in der Asthma-Ambulanz die Erfassung der zu dem Zeitpunkt aktuellen Medikation. Hier wurden mögliche Begleittherapien wie die inhalative Therapie, Theophyllin- sowie Montelukast-Therapie erfasst. Alle Patienten hatten initial, gemäß der Definition „schweres Asthma“ nach der GINA, eine maximale inhalative Therapie. Somit war die inhalative Therapie aller Patienten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses vergleichbar. Wir haben jedoch im Verlauf der Studie keine Daten zu der inhalativen Therapie erhoben. Ebenso wenig wurden Veränderungen weiterer Begleittherapien wie mit Theophyllin und Montelukast im Verlauf der Studie systematisch erfasst. Somit lässt sich nicht sagen, inwiefern die Begleittherapien bzw. die eventuell veränderten Begleittherapien einen Einfluss auf die Studienergebnisse gehabt haben könnten.

4.3 Hypothesen

4.3.1 Dupilumab-Therapie erhöht die TB-Zellpopulation und senkt somit die IgE-Produktion bei Patienten mit schwerem Asthma

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Pilotstudie stellen wir die Hypothese auf, dass die Therapie eines schweren Asthma mit dem Biologikum Dupilumab und somit die Inhibition von IL-4 und IL-13, zu einer erhöhten Anzahl der Transitionalen B-Zellen führt. Wir vermuten, dass der Anstieg dieser B-Zell-Subpopulation im Anschluss eine Unterdrückung der IgE-Produktion, und somit eine verminderte Immunreaktion auf Allergien, zur Folge haben könnte (**s. Abb.18**). Zusätzlich vermuten wir weitere, sich positiv auf die Atemwegsentzündung auswirkenden Effekte durch die erhöhte TB-Zell-Population. Es ist jedoch hervorzuheben, dass wir in der vorliegenden Arbeit nicht die funktionalen Eigenschaften der TB-Zellen analysiert haben und somit nicht die exakte Menge der in der TB-Zell-Population vorhandenen Bregs bestimmen konnten sowie deren Effekt auf IgE-Produktion. Zusätzlich hat diese Studie zwar die Hypothese einer

Senkung des Gesamt-IgE-Spiegels durch die Vermehrung der TB-Zellen aufgestellt, jedoch haben wir aufgrund des Studiendesigns keine Hypothese zu dem Wirkmechanismus dieses Effektes aufstellen können. Hierzu werden weitere Studien benötigt, um zu klären, inwiefern der beobachtete Anstieg in den TB-Zellen mit einer Suppression der IgE-Produktion assoziiert ist, zum Beispiel mittels Zellkulturen.

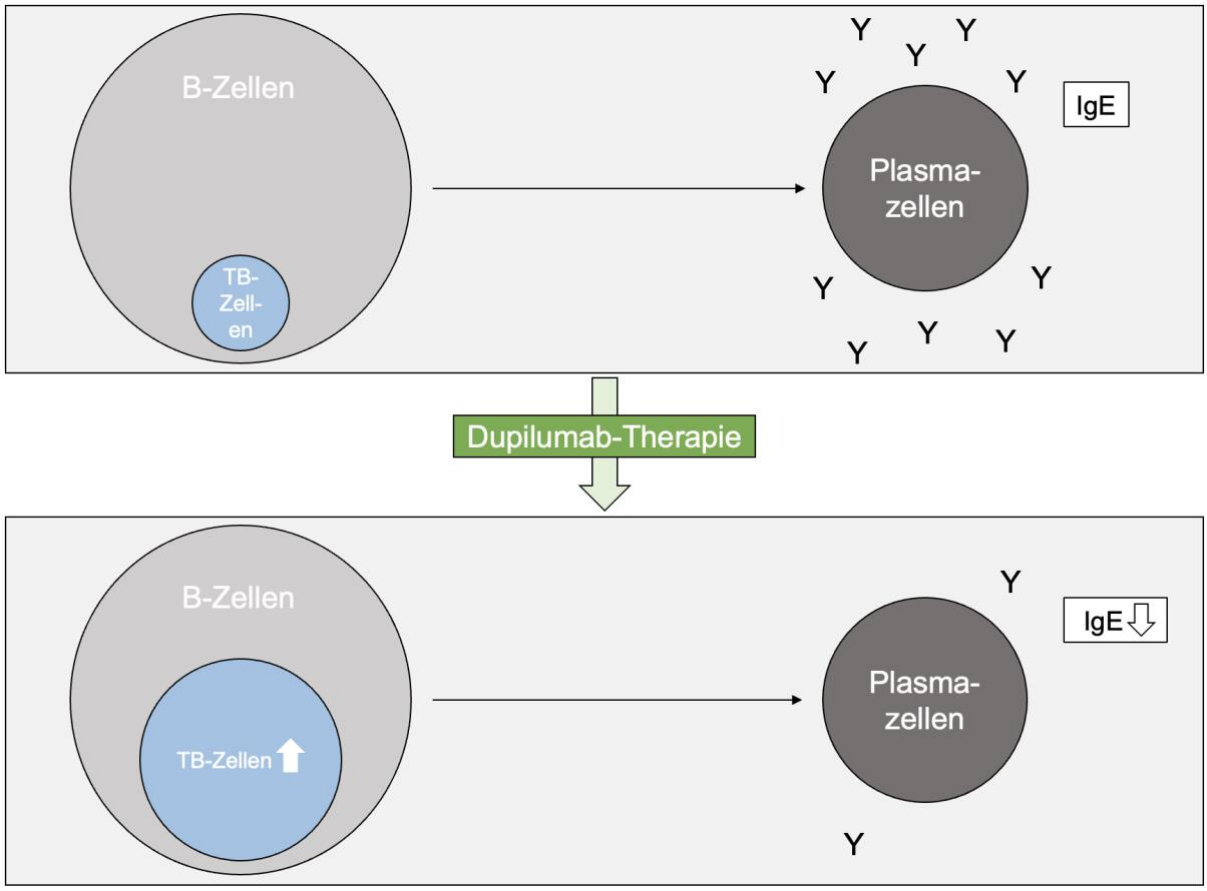


Abbildung 17: Hypothese: Dupilumab-Therapie erhöht die Zellpopulation der TB-Zellen und führt zu einer verminderten IgE-Produktion bei Patienten mit schwerem Asthma
Die TB-Zellen stellen eine Subpopulation der B-Zellen dar. Durch die Reifung der B-Zellen wird ein Teil zu IgE-produzierenden Plasmazellen. Das Immunglobulin E ist maßgeblich an der allergischen Immunantwort beteiligt. Nach einer 6-monatigen Therapie mit Dupilumab (im Vergleich zum Zeitpunkt nach 1 Monat Therapie), kommt es, durch die Blockade der Interleukine IL-4 und IL-13, zu einer Vermehrung der TB-Zellen. Dies führt zu einer verminderten IgE-Produktion, welches eine geringere Immunantwort bei Allergien und Asthma zur Folge hat.

4.3.2 Prädiktoren für ein gutes Therapieansprechen auf Dupilumab bei Patienten mit schwerem Asthma

Wir spekulieren, dass bei Patienten mit einem schweren Asthma, welche die Einschlusskriterien für eine Dupilumab-Therapie erfüllen, niedrige TB-Zellzahlen in Kombination mit einem hohem Gesamt-IgE-Wert vor Therapiebeginn ein Prädiktor für ein gutes klinisches Ansprechen auf das Biologikum darstellen (**s. Abbildung 19**).

Zusätzlich vermuten wir, dass nach 6 Monaten Dupilumab-Therapie eine unveränderte TB-Zellzahl sowie ein insuffizientes klinisches Ansprechen ein Indikator dafür sein könnten, dass eine weiterführende Therapie mit Dupilumab nicht vielversprechend sein wird. Um diese Hypothese weiter testen zu können, sollten größer angelegte klinische Studien durchgeführt werden.

4.3.3 Benralizumab-Therapie führt zu keiner Veränderung der TB-Zellpopulation

Zusätzlich zu erwähnen sind die Messergebnisse unter Benralizumab-Therapie. Hier zeigte sich weder ein TB-Zellzuwachs, noch ein Absinken des Gesamt-IgE-Wertes während der Therapie. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass die durch Dupilumab gehemmten Zytokine IL-4 und IL-13 mehr in der B-Zellreifung sowie in der IgE-Produktion involviert sind als das durch Benralizumab inhibierte Zytokin IL-5 [55]. Somit kann durch die Hemmung von IL-4/IL-13, jedoch nicht von IL-5, ein signifikanter Einfluss auf die B-Zellreifung sowie die IgE-Produktion genommen werden. Eine zusätzliche Ursache könnten die Unterschiede zwischen der Benralizumab- und Dupilumab-Gruppe sein: In der Dupilumab-Gruppe waren mehr Patienten mit respiratorischen Allergien vorhanden als in der Benralizumab-Gruppe. Somit kann es sein, dass behandelbare, IgE-assoziierte Pathophysiologien häufiger in der Dupilumab-Gruppe als in der Benralizumab-Gruppe zu finden waren. Zusätzlich unterschieden sich die Patientengruppen initial in mehreren Eigenschaften (**s. Abschnitt 4.2.1**). Somit kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Benralizumab bei der Patientenpopulation der Dupilumab-Gruppe andere Effekte gezeigt hätte, als es bei der Benralizumab-Patientenpopulation der Fall war.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Regulatorische B-Zellen stellen einen wichtigen Teil des humanen Immunsystems dar und nehmen durch ihre antiinflammatorischen Eigenschaften Einfluss auf chronisch entzündliche Erkrankungen wie Asthma. Biologika sind ein wesentlicher Bestandteil der aktuellen Therapie des schweren Asthma. Die Auswirkung der Biologika auf regulatorische B-Zellen wurde bislang jedoch kaum erforscht. Dies ist jedoch von großer Bedeutung, da hierdurch ein besseres Verständnis der Wirkung der Biologika auf das Immunsystem, sowie der Rolle der B-Zellen und ihrer Subpopulationen etabliert werden kann. In der vorliegenden klinisch-experimentellen Pilotstudie wurde bei jeweils 10 Patienten mit schwerem Asthma von dem behandelnden Arzt die Indikation für eine Biologika-Therapie mit entweder Benralizumab oder Dupilumab gestellt. Es wurden zusätzlich 20 Kontrollen ohne Asthma ausgewählt. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass sich bei der Dupilumab-Gruppe nach 6 Monaten Therapie ein signifikanter Anstieg der Transitionalen B-Zellen ($CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$-Zellen), einer Subpopulation der regulatorischen B-Zellen, einstellte. Parallel konnte eine Senkung des Gesamt-IgE-Wertes unter Dupilumab-Therapie beobachtet werden, was bei Benralizumab nicht der Fall war. Wir stellten die Hypothese auf, dass es durch die Blockade von IL-4/IL-13 über eine Vermehrung der TB-Zellzahl zu einer Hemmung der IgE-Produktion und somit zu einer Reduktion der Atemwegsentzündung kommt. Diese Ergebnisse stellen einen wichtigen Beitrag zu der Asthma-Forschung dar und bieten neue Erkenntnisse der immunmodulatorischen Effekte der Biologika bei Patienten mit schwerem Asthma. Die Ergebnisse wurden im Jahr 2023 im wichtigsten internationalen allergologischen Journal (Allergy) veröffentlicht: dies unterstreicht die Relevanz der Ergebnisse.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. GINA. Global Initiative for Asthma (GINA). 2023 GINA Main Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2023.

2. Nanda A, Wasan AN. Asthma in Adults. *Med Clin North Am.* Jan 2020;104(1):95-108.

3. Sears MR. Trends in the prevalence of asthma. *Chest.* Feb 2014;145(2):219-225.

4. NVL. Nationale VersorgungsLeitlinie (NVL) Asthma. Langfassung. 2020;4. Auflage, Version 1.

5. Pavord ID, Beasley R, Agusti A, et al. After asthma: redefining airways diseases. *Lancet.* Jan 27 2018;391(10118):350-400.

6. Chabra R, Gupta M. Allergic And Environmental Induced Asthma. *StatPearls.* 2020.

7. De Roos AJ, Kenyon CC, Zhao Y, et al. Ambient daily pollen levels in association with asthma exacerbation among children in Philadelphia, Pennsylvania. *Environ Int.* Dec 2020;145:106138.

8. Akar-Ghibril N, Casale T, Custovic A, Phipatanakul W. Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* Feb 2020;8(2):429-440.

9. Humbert M. [Intrinsic asthma]. *Rev Pneumol Clin.* Apr 2003;59(2 Pt 1):84-88.

10. Robinson D, Humbert M, Buhl R, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin Exp Allergy.* Feb 2017;47(2):161-175.

11. Hinks TSC, Levine SJ, Brusselle GG. Treatment options in type-2 low asthma. *Eur Respir J.* Jan 2021;57(1).

12. Lommatzsch Mea. S2k-Leitlinie zur fachärztlichen Diagnostik und Therapie von Asthma 2023. *AWMF Online.* 2023.

13. O'Byrne PM, Reddel HK, Eriksson G, et al. Measuring asthma control: a comparison of three classification systems. *Eur Respir J.* Aug 2010;36(2):269-276.

14. Lommatzsch M, Buhl R, Korn S. The Treatment of Mild and Moderate Asthma in Adults. *Dtsch Arztebl Int.* Jun 19 2020;117(25):434-444.

15. Lommatzsch M. Die 4 wichtigsten Bausteine der Asthmadiagnostik in der Praxis. *MMW Fortschr. Med.* 2023;165(11).

16. Lommatzsch M, Brusselle GG, Canonica GW, et al. Disease-modifying anti-asthmatic drugs. *Lancet.* Apr 23 2022;399(10335):1664-1668.

17. Lommatzsch M. Immune Modulation in Asthma: Current Concepts and Future Strategies. *Respiration.* 2020;99(7):566-576.

18. Toskala E, Kennedy DW. Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol.* Sep 2015;5 Suppl 1(Suppl 1):S11-16.

19. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers.* Sep 10 2015;1(1):15025.

20. Russell RJ, Brightling C. Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci (Lond).* Jul 15 2017;131(14):1723-1735.

21. Berair R, Brightling CE. Asthma therapy and its effect on airway remodelling. *Drugs.* Aug 2014;74(12):1345-1369.

22. Thomas B, Rutman A, Hirst RA, et al. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Oct 2010;126(4):722-729.e722.

23. Guida G, Riccio AM. Immune induction of airway remodeling. *Semin Immunol.* Dec 2019;46:101346.

24. Sutcliffe A, Kaur D, Page S, et al. Mast cell migration to Th2 stimulated airway smooth muscle from asthmatics. *Thorax.* Aug 2006;61(8):657-662.

25. Brightling CE, Ammit AJ, Kaur D, et al. The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.* May 15 2005;171(10):1103-1108.

26. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* May 30 2002;346(22):1699-1705.

27. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol.* Jan 2015;16(1):45-56.

28. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The Cytokines of Asthma. *Immunity.* Apr 16 2019;50(4):975-991.

29. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Sep 2011;128(3):451-462; quiz 463-454.

30. Robinson DS. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Dec 2010;126(6):1081-1091; quiz 1092-1083.

31. Godar M, Blanchetot C, de Haard H, Lambrecht BN, Brusselle G. Personalized medicine with biologics for severe type 2 asthma: current status and future prospects. *MAbs.* Jan 2018;10(1):34-45.

32. Zhang W, Lin C, Sampath V, Nadeau K. Impact of allergen immunotherapy in allergic asthma. *Immunotherapy.* Jun 2018;10(7):579-593.

33. Shamji MH, Sharif H, Layhadi JA, Zhu R, Kishore U, Renz H. Diverse immune mechanisms of allergen immunotherapy for allergic rhinitis with and without asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Mar 2022;149(3):791-801.

34. Virchow JC. Allergen immunotherapy (AIT) in asthma. *Semin Immunol.* Dec 2019;46:101334.

35. Diamant Z, Aalders W, Parulekar A, Bjermer L, Hanania NA. Targeting lipid mediators in asthma: time for reappraisal. *Curr Opin Pulm Med.* Jan 2019;25(1):121-127.

36. Paljarvi T, Forton J, Luciano S, Herttua K, Fazel S. Analysis of Neuropsychiatric Diagnoses After Montelukast Initiation. *JAMA Netw Open.* May 2 2022;5(5):e2213643.

37. Umetsu R, Tanaka M, Nakayama Y, et al. Neuropsychiatric Adverse Events of Montelukast: An Analysis of Real-World Datasets and drug-gene Interaction Network. *Front Pharmacol.* 2021;12:764279.

38. Clarridge K, Chin S, Eworuke E, Seymour S. A Boxed Warning for Montelukast: The FDA Perspective. *J Allergy Clin Immunol Pract.* Jul 2021;9(7):2638-2641.

39. Institute NC. NCI Dictionaries. n.d.; https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biological-therapy. Accessed 13. Mai, 2023.

40. Malaviya AN, Mehra NK. A fascinating story of the discovery & development of biologicals for use in clinical medicine. *Indian J Med Res.* Sep 2018;148(3):263-278.

41. McGregor MC, Krings JG, Nair P, Castro M. Role of Biologics in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* Feb 15 2019;199(4):433-445.

42. Licari A, Marseglia G, Castagnoli R, Marseglia A, Ciprandi G. The discovery and development of omalizumab for the treatment of asthma. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(9):1033-1042.

43. Saco TV, Pepper AN, Lockey RF. Benralizumab for the treatment of asthma. *Expert Rev Clin Immunol.* May 2017;13(5):405-413.

44. Corren J. New Targeted Therapies for Uncontrolled Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* May-Jun 2019;7(5):1394-1403.

45. Lommatzsch M, Marchewski H, Schwefel G, Stoll P, Virchow JC, Bratke K. Benralizumab strongly reduces blood basophils in severe eosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy.* Nov 2020;50(11):1267-1269.

46. Guttman-Yassky E, Bissonnette R, Ungar B, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* Jan 2019;143(1):155-172.

47. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med.* Jun 27 2013;368(26):2455-2466.

48. Brusselle GG, Koppelman GH. Biologic Therapies for Severe Asthma. *N Engl J Med.* Jan 13 2022;386(2):157-171.

49. Parnes JR, Molfino NA, Colice G, Martin U, Corren J, Menzies-Gow A. Targeting TSLP in Asthma. *J Asthma Allergy.* 2022;15:749-765.

50. Busse WW. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. *Allergol Int.* Apr 2019;68(2):158-166.

51. Castro M, Corren J, Pavord ID, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med.* Jun 28 2018;378(26):2486-2496.

52. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1254:1-22.

53. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* Sep 1 2008;112(5):1570-1580.

54. Jansen K, Cevhertas L, Ma S, Satitsuksanoa P, Akdis M, van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. *Allergy.* Feb 5 2021.

55. Ma S, Satitsuksanoa P, Jansen K, Cevhertas L, van de Veen W, Akdis M. B regulatory cells in allergy. *Immunol Rev.* Jan 2021;299(1):10-30.

56. Li X, Ding Y, Zi M, et al. CD19, from bench to bedside. *Immunol Lett.* Mar 2017;183:86-95.

57. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* Mar 2005;5(3):230-242.

58. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* Apr 2013;131(4):959-971.

59. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* Jan 29 2010;32(1):129-140.

60. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* Feb 20 2018;48(2):202-213.

61. Zhao ST, Wang CZ. Regulatory T cells and asthma. *J Zhejiang Univ Sci B.* Sept. 2018;19(9):663-673.

62. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* Aug 1 2000;50(3):184-195.

63. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* Dec 18 2014;41(6):1040-1051.

64. Miyajima S, Shigehara K, Kamekura R, et al. Activated circulating T follicular helper cells and skewing of T follicular helper 2 cells are down-regulated by treatment including an inhaled corticosteroid in patients with allergic asthma. *Allergol Int.* Jan 2020;69(1):66-77.

65. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, et al. Follicular T Helper and Breg Cell Balance in Severe Allergic Asthma Before and After Omalizumab Therapy. *Mol Diagn Ther.* Sep 2021;25(5):593-605.

66. Brosseau C, Durand M, Colas L, et al. CD9(+) Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients. *Front Immunol.* 2018;9:3034.

67. van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhan A, et al. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy.* Apr 2014;44(4):517-528.

68. Wiest M, Upchurch K, Hasan MM, et al. Phenotypic and functional alterations of regulatory B cell subsets in adult allergic asthma patients. *Clin Exp Allergy.* Sep 2019;49(9):1214-1224.

69. Wirz OF, Głobińska A, Ochsner U, et al. Comparison of regulatory B cells in asthma and allergic rhinitis. *Allergy.* Apr 2019;74(4):815-818.

70. Baur XB, Lioubov. Messung von exhaliertem Stickstoffmonoxid - Klinischer Einsatz bei Atemwegserkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt.* 2007;12/2007.

71. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep 1 2011;184(5):602-615.

72. Lommatzsch M, Brusselle GG, Levy ML, et al. A(2)BCD: a concise guide for asthma management. *Lancet Respir Med.* Jan 27 2023.

73. Alzahrani YA, Becker EA. Asthma Control Assessment Tools. *Respir Care.* Jan 2016;61(1):106-116.

74. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol.* Jan 2004;113(1):59-65.

75. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J.* Oct 1999;14(4):902-907.

76. Büsching G, Hilfiker R, Mangold F, et al. *Assessments in der Rehabiliation - Band 3: Kardiologie und Pneumologie* 2008.

77. Hütter B-O. *Diagnostische Verfahren zu Lebensqualität und Wohlbefinden* 2003.

78. Braza F, Chesne J, Durand M, et al. A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy.* Nov 2015;70(11):1421-1431.

79. Gao X, Ren X, Wang Q, et al. Critical roles of regulatory B and T cells in helminth parasite-induced protection against allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol.* Dec 2019;198(3):390-402.

80. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* May 2010;125(5):1114-1124.e1118.

81. Singh A, Carson WFt, Secor ER, Jr., et al. Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *J Immunol.* Jun 1 2008;180(11):7318-7326.

82. Lundy SK, Berlin AA, Martens TF, Lukacs NW. Deficiency of regulatory B cells increases allergic airway inflammation. *Inflamm Res.* Dec 2005;54(12):514-521.

83. Habener A, Happle C, Grychtol R, et al. Regulatory B cells control airway hyperreactivity and lung remodeling in a murine asthma model. *J Allergy Clin Immunol.* Jun 2021;147(6):2281-2294.e2287.

84. Wenzel S, Holgate ST. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* Dec 1 2006;174(11):1173-1176; discussion 1176-1178.
85. Oliveria JP, Agayby R, Gauvreau GM. Regulatory and IgE(+) B Cells in Allergic Asthma. *Methods Mol Biol.* 2021;2270:375-418.
86. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* Feb 21 2018;120:5.1.1-5.1.11.
87. Lommatzsch M, Klein M, Stoll P, Virchow JC. Type 2 biomarker expression (FeNO and blood eosinophils) is higher in severe adult-onset than in severe early-onset asthma. *Allergy.* Oct 2021;76(10):3199-3202.
88. Ricciardolo FLM, Bertolini F, Carriero V. The Role of Dupilumab in Severe Asthma. *Biomedicines.* Aug 27 2021;9(9).
89. Caminati M, Olivieri B, Dama A, et al. Dupilumab-induced hypereosinophilia: review of the literature and algorithm proposal for clinical management. *Expert Rev Respir Med.* Jul 2022;16(7):713-721.
90. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol.* Dec 2021;51(12):2708-3145.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AIT	Allergen-Immuntherapie
ACQ6	Asthma Questionnaire 6
ACT	Asthma Control Test
Ak	Antikörper
APC	AlloPhycoCyanin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCR	B Cell Receptor, B-Zell-Rezeptor
Bm	Basement membrane, Basalmembran
Bregs	Regulatorische B-Zellen
Bv	Blood vessel, Blutgefäß
BV421	Brilliant Violet 421
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungskluster
CpG-ODN	CpG-Oligonukleotid
DC	Dendritische Zellen
DP2	Prostaglandin D2
Ep	Epithelium, Epithel
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FDA	Food and Drug Administration (U.S.)
FEIA	Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay
FeNO	Fraktioniertes exhaliertes Stickstoffmonoxid
FEV1	Forciertes exspiratorisches Volumen (Sekundenkapazität)
FITC	Fluorescein Iso ThioCyanate
FR	Funktionelle Residualkapazität
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreuung
FVC	Forcierte exspiratorische Vitalkapazität
GINA	Global Initiative for Asthma
ICS	Inhalative Kortikosteroide
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC2	Typ-2 innate lymphoide Zellen
ITGV	Intrathorakales Gasvolumen
IVC	Inspiratorische Vitalkapazität
kPa	Kilopascal
LABA	Langwirksame Beta-2-Sympathomimetika
LAMA	Langwirksame Anticholinergika
LTRA	Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten
MEF25,50,75	Maximaler exspiratorischer Fluss bei 25/250/75% FVC-Restvolumen
NA	Not applicable, nicht anwendbar
NA_2CO_3	Natriumcarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
NVL	Nationale Versorgungsleitlinie
OCS	Orale Kortikosteroide

PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	PhycoErythrin
PEF	Peak exspiratory flow, Exspiratorischer Spitzenfluss
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Preotein-Cyanine 5.5
PGD2	Prostaglandin D2
ppb	Parts Per Billion, Teile per Mrd.
R	Rezeptor
Raw	Atemwegswiderstand
Reff	Effektiver Atemwegswiderstand
RV	Residualvolumen
SABA	Kurzwirkende Beta-2-Sympathomimetika
SGRQ	Saint George´s Respiratory Questionnaire
Sm	Smooth muscle, Glatte Muskelzellen
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreuung
Tab	Tabelle
TB-Zellen	Transitionale B-Zellen
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
Th	T-Helferzellen
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
VC	Vitalkapazität

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Hinweise auf Vorliegen einer Typ-2-Entzündung 3

Abb. 2 Ermittlung der Asthma-Kontrolle mittels vier Fragen der Global Initiative for Asthma (GINA) 4

Abb. 3 Wandel der Asthmatherapie in den letzten 50 Jahren 6

Abb. 4 Stufenschema der Asthma-Therapie 7

Abb. 5 Definition „schweres Asthma“ gemäß Leitlinie 2023 9

Abb. 6 Histologische Veränderung der Atemwege bei Asthma im Vergleich zu gesundem Gewebe 10

Abb. 7 Asthma Immunpathologie: Die Typ-2-Idee 12

Abb. 8 Immunpathologie und Immunmodulation des „Type-2-High-Asthma“ 17

Abb. 9 Die Entwicklung der B-Zellen 20

Abb. 10 Ganzkörperplethysmograph 26

Abb. 11 Das FeNO-Messgerät 29

Abb. 12 Dotplots der B-Zell-Gating-Strategie 35

Abb. 13 Boxplot-Darstellung der Gesamt-B-Zellzahl vor Biologika-Therapie 45

Abb. 14 Boxplot-Darstellung der TB-Zellpopulation vor Biologika-Therapie 45

Abb. 15 Boxplot-Darstellung der TB-Zellpopulation während Benralizumab-Therapie 46

Abb. 16 Boxplot-Darstellung der TB-Zellpopulation während Dupilumab-Therapie 46

Abb. 17 Hypothese: Dupilumab-Therapie erhöht die Zellpopulation der TB-Zellen und führt zu einer verminderten IgE-Produktion bei Patienten mit schwerem Asthma 58

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Definition der Asthma-Remission 5

Tab. 2 Zugelassene Biologika für schweres Asthma 15

Tab. 3 Mit der Bodyplethysmographie messbare Parameter..... 28

Tab. 4 Antikörper für die FACS..... 33

Tab. 5a Patientencharakteristika bei Studieneinschluss und während Biologika-Therapie 42

Tab. 5b Patientencharakteristika bei Studieneinschluss und während Biologika-Therapie 43

Tab. 6a-b Prozentzahlen von B-Zell-Populationen vor Therapie und unter Benralizumab-/ Dupilumab-Therapie..... 49

Tab. 6c-d Zellkonzentrationen von B-Zell-Populationen vor Therapie und unter Benralizumab-/ Dupilumab-Therapie 50

7.4 Publikationen

Lommatzsch M, **Dost M**, Jaishankar N, Weise M, Stoll P, Virchow JC, Bratke K.
Dupilumab treatment increases transitional B cells in severe asthma.
Allergy
(Impact Factor 2022: 14,71)
DOI: 10.1111/all.15703 /Vol 78, Issue 4, April 2023

Posterpräsentation auf dem ERS-Kongress 2022, Barcelona (Posternr.: PA925)
Lommatzsch M, **Dost M**, Jaishankar N, Weise M, Stoll P, Virchow JC, Bratke K.
Dupilumab treatment increases transitional B cells (regulatory B cells) in severe asthma.
Präsentiert von M. Dost am 04.09.2022.

7.5 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name:	Marieke Dost
Geburtsdatum:	14.05.1995
Geburtsort:	Bremen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

SCHULAUSBILDUNG

2001 – 2002	Grundschule Schönebeck, Bremen
2002 – 2004	Deutsche Schule London
2004 – 2005	Grundschule Schönebeck, Bremen
2005 – 2011	Ökumenisches Gymnasium zu Bremen
2011 – 2012	Richmond College, London
2012 – 2014	Ökumenisches Gymnasium zu Bremen, Allgemeine Hochschulreife

MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

10 / 2015	Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
09 / 2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 2020	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06 / 2020	Beginn Promotion in der Abteilung für Pneumologie, Klinik für Innere Medizin, Universität Rostock
10 / 2020 – 10 / 2021	Zwei Semester als Promotionsstudentin
11 / 2021 – 10 / 2022	Praktisches Jahr
11 / 2022	Approbation als Ärztin

PRAKTISCHES JAHR

Chirurgie	Klinikum Südstadt Rostock
11 / 2021 – 03 / 2022	Abteilung für Unfallchirurgie/Orthopädie und Handchirurgie
Innere Medizin	Universitätsklinikum Regensburg
03 / 2022 – 07 / 2022	Abteilung für Innere Medizin I + II - Gastroenterologie - Kardiologie
Pädiatrie	Vivantes Klinikum Friedrichshain, Berlin
07 / 2022 – 10 / 2022	Abteilung für Allgemeinpädiatrie, Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin

FAMULATUREN

07 / 2018	Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Universitätsmedizin Rostock
08 / 2018	Abteilung für Anästhesie, Intensiv- und Notfallmedizin,

	Ev. Diakonie-Krankenhaus Bremen
02 / 2019	Praxis für Allgemeinmedizin und Innere Medizin Prisdorf, Schleswig-Holstein
07 / 2019	Abteilung für Neurologie Krankenhaus Meran, Südtiroler Sanitätsbetrieb
02 / 2020	Praxis für Allgemeinmedizin und Innere Medizin Prisdorf, Schleswig-Holstein

7.6 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch. Als Betreuer dieser Studie hat er keine Zeit und Mühen gescheut mich stets zu unterstützen und konstruktive Anregungen beizusteuern. Sowohl fachlich als auch im Patientenumgang habe ich viel von ihm lernen können. Besonders einprägsam war die Präsentation der Ergebnisse dieser Arbeit auf dem ERS-Kongress 2022 in Barcelona. Durch Herrn Prof. Lommatzsch konnte ich in die internationale Welt der Forschung eintauchen. Für diese tolle Erfahrung, sowie das in mich gesetzte Vertrauen, möchte ich ihm an dieser Stelle herzlich danken.

Außerdem danken möchte ich den Mitarbeitern der Pneumologischen Ambulanz, Prof. Dr. med. M. Lommatzsch sowie dem Studienbüro für die Unterstützung bei der Rekrutierung sowie der klinischen Untersuchung und Befragung der Patienten und Probanden.

Ein großer Dank gilt ebenfalls dem immunologischen Labor. Dr. rer. nat. Kai Bratke sowie Anna Junge standen immer für Fragen zur Verfügung und ich möchte mich besonders für die Hilfe bei den komplexen immunologischen Messungen bedanken.

Meinen Eltern danke ich an dieser Stelle für ihr immerwährendes Vertrauen in mich meinen Weg zu gehen, sowie für ihre Liebe und Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ebenso danke ich meinen Großeltern, da sie mir stets beistanden und meine Schwester und mich wo es nur ging unterstützten. Meiner Schwester Janina, welche mir immer als Vorbild diente, danke ich ebenfalls für ihren ständigen Rückhalt, Ratschläge und aufbauenden Worte, welche mich stets begleiteten. Ein großer Dank gilt auch meinem Freund Martin, denn durch ihn gelang die initiale Kontaktaufnahme mit Prof. Lommatzsch, sowie danke ich ihm für seine unerschöpfliche Geduld, emotionale Unterstützung und Hilfe während der Fertigstellung dieser Arbeit. Zuletzt gilt ein großer Dank allen Patienten und Probanden für die Bereitschaft an der Studie teilzunehmen.

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Marieke Dost Rostock, im Mai 2023

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

Einfluss von Biologika-Therapien auf B-Zell-Subpopulationen von Patienten mit schwerem Asthma

Eine klinisch–experimentelle Studie

THESEN ZUR DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)
vorgelegt der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

von
Marieke Dost aus Bremen

Rostock, Mai 2023

8 THESEN

1) Biologika spielen eine entscheidende Rolle in der Behandlung von schwerem Asthma. Obwohl die Literatur die Wirksamkeit dieser Medikamente bei Patienten mit schwerem Asthma umfassend beschreibt, ist der Mechanismus sowie die Auswirkung dieser immunmodulatorischen Medikamente auf das humane Immunsystem nicht abschließend geklärt.
2) B-Zellen stellen einen wichtigen Teil des humanen Immunsystems dar. Die Subpopulation der regulatorischen B-Zellen (Bregs) rücken aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten immer mehr in den Fokus der Forschung. Mausmodelle sowie humane Studien versuchen die Population der Bregs zu definieren und ihre Funktion im Immunsystem besser zu verstehen. Diese Forschung steht erst am Anfang. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Bregs eine Rolle in Erkrankungen wie dem allergischen Asthma spielen.
3) Da die Biologika-Therapie immunmodulatorische Eigenschaften hat und die Bregs ebenfalls im Immunsystem agieren, stellt sich die Frage, ob sich eine Biologika-Therapie auf diese B-Zell-Subpopulation auswirkt. Diese Fragestellung wurde bislang jedoch nicht erforscht.
4) In der vorliegenden Studie wurde von dem behandelnden Arzt bei 10 Patienten mit schwerem Asthma die Indikation für die Benralizumab-, sowie bei 10 Patienten die Indikation zur Dupilumab-Therapie gestellt, sowie 20 Kontrollpatienten untersucht. Es wurden bei allen Patienten (neben weiteren Parametern) B-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie analysiert, sowie deren Veränderungen im Verlauf der Biologika-Therapie erfasst.
5) Vor Therapiebeginn konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der B-Zell-Subpopulationen in der Benralizumab- als auch Dupilumab-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.
6) Es zeigte sich, dass eine 6-monatige Dupilumab-Therapie die Zahl der Transitionale B-Zellen (TB-Zellen; $CD19^{+}CD24^{++}CD38^{++}$) im Blut erhöht. Dieser Effekt fand sich unter Benralizumab-Therapie nicht.
7) Parallel zu der erhöhten Anzahl der TB-Zellen zeigte sich ein IgE-Abfall unter Dupilumab-Therapie.
8) Abgesehen von den TB-Zellen wurde bei den B-Zell-Subpopulationen der $CD24^{+}CD27^{+}$-, $CD19^{+}CD27^{-}IgD^{+}$-, $CD19^{+}IgD^{+}CD27^{+}$- sowie $CD19^{+}IgD^{-}CD27^{+}$-

Zellen weder unter Benralizumab- noch Dupilumab-Therapie eine Veränderung in ihrer Anzahl festgestellt.

9) Wir haben anhand der erhobenen Ergebnisse die Hypothese aufgestellt, dass es durch die Therapie mit dem Biologikum Dupilumab über die Hemmung von IL-4/IL-13 zu einer Erhöhung der TB-Zellzahl kommt, und dies in einer Unterdrückung der IgE-Synthese mit nachfolgender Verminderung der Atemwegsentzündung resultiert.
10) Die Ergebnisse haben große Bedeutung für die Asthma-Forschung sowie das Verständnis der Effekte von Biologika-Therapien auf das menschliche Immunsystem. Die Ergebnisse wurden im wichtigsten internationalen allergologischen Journal (Allergy) publiziert.