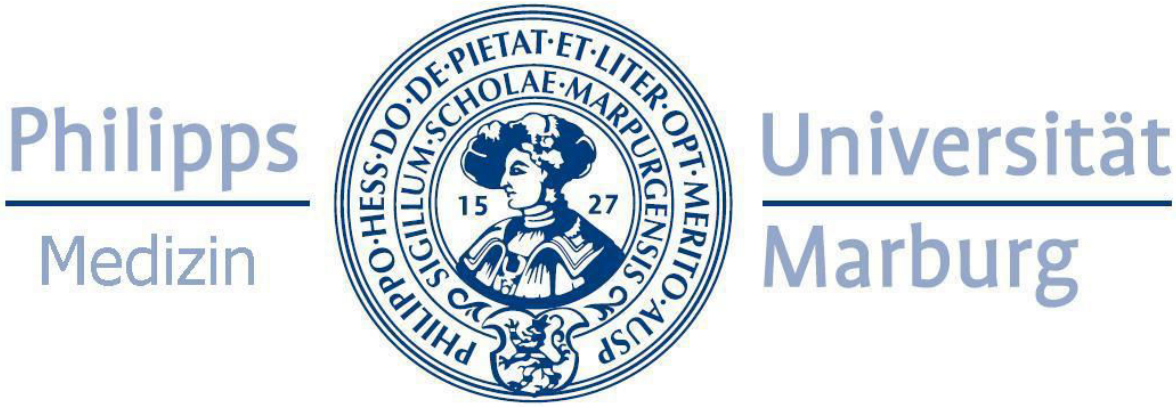
Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik

Direktor: Professor Dr. med. Harald Renz



des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Potentielle Biomarker zur Identifikation des TH2-hoch-Endotyps im Asthma bronchiale

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sebastian Lauer

aus Paderborn

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg am: 18.11.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. H. Renz

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. B. Schmeck

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung……1

1.1 Äthiologie des Asthma bronchiale……2
1.1.1 Die Hygienehypothese……4
1.2 Klinik des Asthma bronchiale……5
1.3 Pathophysiologie des Asthma bronchiale……5
1.4 Das erweiterte Konzept der Pathogenese des Asthma bronchiale…..6
1.4.1 Mechanismen der Allergieentstehung……6
1.4.2 Die Sensibilisierungsphase……7
1.4.3 Das TH1-/TH2-Konzept, Differenzierung der T-Lymphozyten…..8
1.4.3.1 Die TH2-Differenzierung……8
1.4.3.2 Die TH1-Differenzierung……10
1.4.3.3 Toll-like-Rezeptoren, regulatorische T-Zellen und TH17-Zellen……11
1.4.4 Effektorzytokine……12
1.4.5 Die Effektorphase……13
1.4.6 Die Chronifizierung……15
1.5 Target-basierte Therapieansätze……20
1.6 Zelluläre Phänotypen……25
1.7 Molekular-immunologische Phänotypisierung……31
1.7.1 Molekulare Phänotypen……31
1.7.2 Surrogatmarker einer TH2-Entzündung durch Genome-wide-profiling……35
1.7.3 TH2-hoch und TH2-niedrig-Phänotypen……39
1.8 Potentielle Biomarker……57
1.8.1 CLCA 1……57
1.8.2 Serpin B2 (PAI 2)……59
1.8.3 Periostin……61
1.8.4 CCL 26 (MIP 4)……65
1.8.5 Mucine……66
1.8.5.1 MUC 5 AC……67
1.8.5.2 MUC 5 B……70
1.8.6 Carboxypeptidase A3……71
1.8.7 Osteopontin……72

2. Fragestellung……..77

3. Material und Methoden……..79

3.1 Patienten und Kontrollen……..79
3.2 Ein- und Ausschlusskriterien……80
3.3 Patientencharakteristika……..80
3.4 Präanalytik……81
3.5 Definitionen und Berechnungen……..82
3.5.1 LOD……82
3.5.2 LOQ……82
3.5.3 Variationskoeffizient VK……83
3.5.4 Intra- und Interassay……84
3.5.5 T-Test, Varianzanalyse (ANOVA), p-Werte……85
3.5.6 Korrelationskoeffizient r……88
3.5.7 Regressionsanalysen……88
3.5.8 Regressionsgerade, Slope, Intercept……89
3.6 Beschreibung der ELISAs……90
3.6.1 Beschreibung der Antikörper……90
3.6.2 Beschreibung der Reagenzien und Durchführung der ELISAs….91
3.6.3 Cut-off, Detection-Range, Kreuzreaktivität (Herstellerangaben)……97
3.7 Geräte und Software……98
3.8 Weitere Materialien und Reagenzien……99

4. Resultate……100

4.1 Validierung der ELISAs, Testcharakteristika und Leistungsdaten..100
4.1.1 Analytische Sensitivität……100
4.1.2 Präzision……102
4.1.2.1 Messpräzision, Intraassay……102
4.1.2.2 Methodenpräzision, Interassay……104
4.1.3 Verdünnungslinearität……105
4.1.4 Korrelation Serum und Plasma, Regressionsanalyse……107
4.2 Wertelage in den Subgruppen, Verteilung als Boxplots, Signifikanzunterschiede……113
4.3 Synopsis der Leistungsdaten……123
4.4 Zusammenfassung der Resultate……126

5. Diskussion……127

5.1 Diskussion der einzelnen Biomarker……127
5.1.1 CLCA1……127
5.1.2 Carboxypeptidase A3……128
5.1.3 CCL 26……129
5.1.4 Osteopontin……130
5.1.5 PAI 2……131
5.1.6 MUC 5AC und MUC 5B……133
5.1.7 Periostin……134
5.2 Zusammenfassende Wertung und Beurteilung der Testcharakteristika……135
5.3 Periostin als Biomarker der TH2-Inflammation……137
5.4 Fazit……145

6. Zusammenfassung……147

7. Summary……150

8. Verzeichnisse……153
8.1 Literaturverzeichnis……153
8.2 Abbildungsverzeichnis……162
8.3 Tabellenverzeichnis……165

9. Anhang……166
9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer……166
9.2 Danksagung……166
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung……166

1. Einleitung

1.1 Äthiologie und Epidemiologie des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale stellt eine chronisch-inflammatorische Erkrankung des unteren Respirationstraktes dar, welche mit einer variabel ausgeprägten, transienten und reversiblen Atemwegsobstruktion einhergeht. Die chronische Entzündungsreaktion ist assoziiert mit einer Hyperreagibilität des Bronchialsystems gegenüber multiplen endogenen und exogenen Stimuli.

Die klinische Manifestation des Entzündungsgeschehens ist eine obstruktive Ventilationsstörung. Sie zeigt sich anfallsweise im Auftreten von obstruktionsbedingter Atemnot auf dem Boden einer entzündlichen Schwellung der Bronchialschleimhaut, einer glattmuskulären Bronchokonstriktion sowie einer Dyskrinie und Hypersekretion zähen Schleims (92).

Bei länger bestehendem Asthma bronchiale kann es im Verlauf zu einer strukturell fixierten Obstruktion, dem sogenannten Atemwegs-Remodeling kommen.

Das Asthma bronchiale kann gesehen werden als ein multifaktorielles Syndrom bestehend aus der Trias bronchiale Entzündung, bronchiale Obstruktion und bronchiale Hyperreaktivität, wobei diese Charakteristika sowohl von endogenen Faktoren als auch von Umweltfaktoren beeinflusst werden. Es kann angenommen werden, dass für die Entstehung der Erkrankung genetische Einflüsse und die Beziehung zwischen Genetik und Umwelt eine determinierende Rolle spielen (92, 53, 47, 105). Beim Asthma handelt es sich also um eine komplexe Erkrankung mit einer multifaktoriellen Genese im Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und diversen Umwelteinflüssen (47, 105).

Es werden verschiedene Formen des Asthma anhand äthiologischer und klinisch orientierter Kriterien unterschieden: eine grobe Einteilung stellt die Abgrenzung des exogen-allergischen vom nicht allergischen Asthma dar.

Das extrinsische oder allergische Asthma ist eine mit Umweltantigenen bzw. –Allergenen assoziierte Atemwegserkrankung, welche typischerweise mit einer IgE-vermittelten Sofortreaktion und nachfolgender zellulär vermittelter Spätreaktion einhergeht. Potentielle Allergene können unter anderem Hausstaubmilben, Tierepithelien, Schimmelpilze, Blüten- und Gräser Pollen oder Mehlstaub sein. Die Entwicklung eines exogen-allergischen Asthma bronchiale ist vor dem Hintergrund einer atopischen Prädisposition zu sehen (47).

Im Gegensatz hierzu entwickelt sich ein nicht-allergisches oder intrinsisches Asthma häufig nach einem respiratorischen Infekt der oberen oder unteren Luftwege. Möglicherweise spielen dabei endogene Faktoren im Sinne einer autoimmunologischen Reaktion eine Rolle. Neben respiratorischen (Virus-) Infekten ist eine Vielzahl auslösender Faktoren bekannt wie körperliche Anstrengung, kalte Luft, Stress und Emotionen oder Inhalationsnoxen wie Zigarettenrauch, Ozon, Nitrosegase, Schwefeldioxid, Chlorgase und diverse weitere Noxen (135, 75, 156, 157, 61, 60, 68, 67, 79, 41).

Mischformen zwischen allergischem und nicht-allergischem Asthma sind denkbar, und da beiden Formen genetische und somit intrinsische Faktoren zugrunde liegen und da beide Formen auch koexistieren können, ist eine absolut strikte Trennung manchmal nur unter Vorbehalt möglich.

Sonderformen in der auf klinischen oder äthiologischen Kriterien basierenden Einteilung stellen das medikamentenassoziierte Asthma (Analgetika wie ASS oder Beta-Blocker), das refluxbedingte Asthma, Wurmasthma, das anstrengungsinduzierte Asthma oder psychogenes Asthma dar.

Aus unterschiedlichen Ländern weltweit wurde seit der Mitte des 20. Jahrhunderts ein deutlicher Anstieg der Prävalenz des Asthma bronchiale

berichtet. Insbesondere bezieht sich die Zunahme der Prävalenz auf das Kindesalter, somit ist das Asthma bronchiale zur häufigsten chronischen Erkrankung des Kindesalters avanciert (5). Die Häufigkeit als auch die Zunahme der Prävalenz ist weltweit betrachtet jedoch deutlich unterschiedlich (108, 159, 107). Nach einem signifikanten Anstieg in den letzten Jahrzehnten in den westlichen Industrienationen scheint in manchen Ländern inzwischen ein Plateau erreicht worden zu sein. Insgesamt zeigen viele osteuropäische Staaten eine geringere Prävalenz als westeuropäische; asiatische und südamerikanische (Schwellen-)Länder zeigen (trotz teilweise starker Umweltbelastungen) niedrigere Prävalenzen als industrialisierte Länder (108, 159, 107). Insgesamt scheint jedoch auch in den Schwellenländern ein Trend zur Zunahme der Prävalenz zu bestehen. Diese Zunahme kann nicht allein durch eine Änderung der genetischen Prädisposition in den Populationen erklärt werden, sie scheint insofern wohl eher auf Veränderungen in der Lebensumwelt zurückzuführen zu sein (108, 159, 107). Die Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes von Asthmasymptomen (wie z.B. Wheezing) und Unterschiede in der Diagnostik und Selbstwahrnehmung der Betroffenen können die Ergebnisse epidemiologischer Studien beeinflussen. Es besteht noch keine völlige Klarheit über die Ursachen der Prävalenzzunahme. Da teilweise in Regionen mit starker Luftverschmutzung niedrige Prävalenzraten gefunden werden, kann eine verstärkte Industrialisierung keine hinreichende Erklärung für eine Umweltkomponente in der Pathogenese darstellen. Diskutiert werden als weitere exogene Faktoren neben Einflüssen durch Wohnverhältnisse (Hausstaubmilben, Innenraumbedingungen), auch Ernährungsgewohnheiten, seltenere Infektionsexpositionen kleiner Kinder, unkritischer Antibiotikaeinsatz und eine veränderte Allergenexposition im Sinne einer vermehrten Aggressivität von potentiellen Allergenen unter der Einwirkung neuzeitlicher Umweltfaktoren (108, 159, 107, 47). Auch eventuelle psychogene Komponenten sind Gegenstand der Diskussion.

1.1.1 Die Hygienehypothese

Der Zusammenhang zwischen einer relativen Sterilisierung der Lebensumgebung und einer daraus folgenden Prädisposition für das Entstehen atopischer Erkrankungen wird durch die Hygienehypothese beschrieben und ist durch verschiedene mikrobiologische sowie epidemiologische Studien belegt (47, 142, 143, 22).

Entsprechend der Hygienehypothese stellt das mikrobielle Milieu der Umweltumgebung einen wichtigen Faktor zur Entstehung allergischer Erkrankungen dar. Aus einer relativen Sterilisation der Lebensumgebung ergibt sich demzufolge eine Prädisposition für Allergien. Zur Stützung dieser Hypothese finden sich in verschiedenen epidemiologischen und mikrobiologischen Studien deutliche Hinweise, wie zum Beispiel der Vergleich von Populationen aus Ost- und Westdeutschland vor 1989 sowie der Vergleich von ländlichen, insbesondere in der Landwirtschaft tätigen Populationen zu städtischen Populationen (47, 112, 113, 66, 114).

Die Menge an Endotoxinen des mikrobiellen Umweltmilieus korreliert den Studien zufolge negativ mit der Zytokinproduktion von IL-10, IL-12, IFN-gamma und TNF-alpha sowie der Entstehung von allergischen Erkrankungen. Ein reger Kontakt zu mikrobiellen Endotoxinen führt offensichtlich zu einer größeren Toleranz gegenüber potentiellen Allergenen (47, 20, 106, 44).

1.2 Klinik des Asthma bronchiale

Als chronisch remittierende Erkrankung ist Asthma bronchiale gekennzeichnet durch akute Exazerbationen einhergehend mit akuter, plötzlich auftretender Dyspnoe. Das Expirium ist typischerweise verlängert und geht aufgrund der Verengung der Atemwege mit einem Giemen einher. Aufgrund des erhöhten Sympathikotonus besteht Tachykardie. Als Akutkomplikation kann es zum Status asthmatikus kommen, einer länger als 24h bestehenden Symptomatik. Akute Lebensgefahr kann auftreten bei zunehmender Hypoxie und Hyperkapnie, einhergehend mit Bradykardie, zunehmender Erschöpfung und Somnolenz (76).

1.3 Pathophysiologie des Asthma bronchiale

Das Korrelat aller pathophysiologisch ablaufenden Prozesse ist eine anfallsartig auftretende Atemwegsobstruktion. Hier kommt es zum einen durch eine entzündungsbedingte Schwellung der bronchialen Schleimhaut zu einem Bronchialwandödem, zum anderen durch eine abnorme Schleimproduktion zu Hyper- und Dyskrinie und zum Dritten durch die glattmuskuläre Bronchokonstriktion zum Bronchospasmus (76).

Letztendlich kann ein irreversibler Umbau der Atemwege resultieren, das Atemwegs-Remodeling, welches sich in erster Linie als eine subendotheliale Fibrose manifestiert (76).

1.4 Das erweiterte Konzept der Pathogenese des Asthma bronchiale

1.4.1 Mechanismen der Allergieentstehung

Immunologisch basiert die chronische Entzündungsreaktion auf einer komplexen Interaktion verschiedener Entzündungszellen wie T-Lymphozyten, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten oder Antigen-präsentierenden Zellen und Strukturzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, bronchialen Epithelzellen und Myofibroblasten sowie deren Produkten. Eine verstärkte Expression proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine wie zum Beispiel IL-4, IL-5 oder IL-13 durch die am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen vermittelt die pulmonale Entzündungsreaktion. $CD4^+$-T-Lymphozyten besitzen hier einen zentralen regulatorischen Einfluss auf die Pathogenese der Inflammation; Dynamik, Ausprägung und Schweregrad wird durch die Sekretion spezifischer Zytokinmuster modifiziert und gesteuert (70, 14).

Als zentrale Zellen in der Regulation des immunologischen und inflammatorischen Prozesses sind die T-Lymphozyten unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage, sich aus naiven TH0-Zellen in effektorische T-Helfer-Zellen zu differenzieren; prototypisch sind hierbei die Subtypen TH1- und TH2-Zellen. Diese T-Zellen können Effektorantworten auf der Ebene des angeborenen Immunsystems – hier repräsentiert durch eosinophile Granulozyten und Mastzellen – auslösen. Aber auch auf der Ebene des erworbenen Immunsystems, nämlich der Ebene der B-Lymphozyten, können Effektorantworten herbeigeführt werden, und somit die Produktion von Antikörpern – hier im Besonderen IgE – gesteuert werden. T-Lymphozyten sind also durch die Differenzierung in den jeweiligen Subtyp in der Lage, unterschiedliche Immunantworten herbeizuführen (70, 14). Aus einer naiven CD4-positiven T-Helferzelle können also unter komplexen Bedingungen verschiedene Subtypen differenzieren, wobei die TH1 und die TH2-Zelle einen besonderen Stellenwert einnehmen. TH1-Zellen bewirken eher eine

zellvermittelte Immunantwort, die TH2-Zellen eine humoral vermittelte. Bei atopisch veranlagten Menschen ist das Gleichgewicht zwischen den beiden Immunantworten gestört und zugunsten einer TH2-Antwort verschoben (14, 70, 47).

1.4.2 Die Sensibilisierungsphase

Den Ausgangspunkt in der Immunpathogenese allergischer Entzündungen und somit auch den des Asthma bronchiale bildet die lokale Aufnahme des Allergens und der Kontakt zu antigenpräsentierenden Zellen im Rahmen der Sensibilisierungsphase (Erstkontakt). Die lokale Aufnahme erfolgt über die Schleimhäute des bronchialen bzw. respiratorischen Epithels, was eine Freisetzung von Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), IL-33 und IL-25 zur Folge hat. TSLP aus den bronchialen Epithelzellen vermittelt nun die Migration und Aktivierung dendritischer Zellen. Durch antigenpräsentierende Zellen, zu denen neben Makrophagen auch insbesondere das Netzwerk dendritischer Zellen des respiratorischen Epithels zählt, erfolgt eine Prozessierung des Antigens und eine Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle. Die folgende Allergen- bzw. Antigenerkennung über den T-Zell-Rezeptor der zunächst noch naiven CD4-positiven T-Lymphozyten vom Helfertyp führt je nach kostimulierenden Molekülen und vorherrschendem Zytokinmilieu sowie unter autokriner Stimulierung durch IL-2 zu einer klonalen T-Helfer-Zell-Proliferation, welche in der weiteren Folge einen IgE-Isotypenswitch in B-Zellen mit all den daraus resultierenden, weiter unten beschriebenen Effekten vermittelt (14, 70, 74).

1.4.3 Das TH1-/TH2-Konzept, Differenzierung der T-Lymphozyten

Weiterhin erfolgt unter dem Einfluss der durch die Epithelzellen sezernierten Zytokine IL-33 und IL-25 die Freisetzung von IL-13 und IL-5 aus IL-25-Rezeptor-positiven, MHC-Klasse-II-positiven Zellen, welche ihrerseits wiederum die Ausdifferenzierung naiver T-Zellen zu einer spezifischen Lymphozyten-Subpopulation, nämlich den TH-2-Zellen induzieren (14, 42, 103, 124). Offensichtlich handelt es sich bei den IL-25-Rezeptor-positiven Zellen um MHC class II (high), CD11c(dull), und lineage(-)-Zellen, jedoch um welche Zellen konkret scheint noch nicht abschließend geklärt zu sein.

Grundsätzlich vermögen die naiven oder TH0-Zellen sich in verschiedenste spezifische Effektor-Zellen zu differenzieren, jedoch erfolgt im Falle einer allergischen Erkrankung bzw. atopischen Prädisposition unter dem Einfluss diverser, im Folgenden näher ausgeführten, komplexer Signale, welche im Rahmen der Kommunikation zwischen den naiven T-Zellen sowie den antigenpräsentierenden Zellen ausgetauscht werden, die Differenzierung zu den TH2-Zellen. Bei nicht atopischen Individuen würde eine geringe Menge Antigen mit schwacher Affinität zum T-Zell-Rezeptor eher eine TH2-lastige Immunantwort auslösen, größere Mengen mit hoher Affinität eine TH1-Antwort (81).

1.4.3.1 Die TH2-Differenzierung

Die Induktion von TH2-Zellen ist prototypisch für das Entstehen atopischer Erkrankungen, die präferenzielle Differenzierung in den TH-2-Phänotyp wird vermutlich gesteuert durch genetische Gegebenheiten wie auch durch die Interaktion dieser genetischen Voraussetzungen mit Umwelteinflüssen wie dem mikrobiellen Milieu, welches unter anderen Gegebenheiten Immunantworten auch hin zu Toleranz modifizieren kann (70).

Eine mögliche Bedeutung kommt hier dem von den bronchialen Epithelzellen produziertem Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) sowie dem GM-CSF zu. Diese spielen eine Rolle in der Art und Weise, wie eine Dendritische Zelle aktiviert wird, und können so mit dazu beitragen, ob die Reaktion auf ein Allergen entweder eine TH2-Antwort oder Toleranz generiert. Eine weitere Schlüsselfunktion liegt in kostimulierenden Signalen. Eine T-Zelle benötigt zur Aktivierung neben einem antigenspezifischen Signal über die Bindung von Antigen über den T-Zell-Rezeptor und Interaktion mit MHC-Klasse-II-Molekülen ein weiteres Signal über kostimulierende Moleküle. Diese ebenfalls von APC-Zellen exprimierten Oberflächenmoleküle können sowohl inhibierende Wirkung als auch aktivierende Wirkung haben. So kann eine Interaktion von APC-ständigem CD80 mit dem T-Lymphozyten-CD28 diesen aktivieren; eine Interaktion zwischen APC-CD86 mit dem zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierten Antigen CTLA-4 inhibiert diesen und reguliert die Immunantwort hin zur Toleranz (14, 104).

Zur Transformation in eine TH2-Zelle führt die Stimulation des T-Zell-Rezeptors der naiven $CD4^+$-T-Zelle und Induktion des Transkriptionsfaktors NFAT1, welcher in Anwesenheit von IL-4 und auch IL-6 die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors GATA3 induziert - eines kritischen Regulators der TH2-Differenzierung (104, 6, 111, 127). Durch Aktivierung des IL-4-Rezeptors durch seinen Liganden IL-4 wird über STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) ebenfalls der Transkriptionsfaktor GATA3 aktiviert. GATA3 wird phosphoryliert und aktiviert durch p38 MAPK, was in einer Translokation aus dem Zytosol in den Kern resultiert, um hier in der Folge Gene auf Chromosom 5q31-33 zu aktivieren, die wiederum für IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF kodieren (14, 104, 70, 6, 111, 127).

GATA3 inhibiert STAT-4 sowie T-bet (den Transkriptionsfaktor, der den TH1-Zelltyp reguliert), wodurch eine TH2-Polarisation entsteht. Im Umkehrschluss kann T-bet GATA3 inhibieren. Weitere Transkriptionsfaktoren sind ebenfalls

involviert in die TH2-Differenzierung wie beispielsweise NF-IL-6, AP-1 und c-Maf. Eine IL-4 unabhängige Weise der TH2-Transformation wurde über die Aktivierung von Notch Rezeptoren auf naiven T-Zellen vorgeschlagen, welche ebenfalls eine GATA3-Expression induzieren können (104, 70, 14).

1.4.3.2 Die TH1-Differenzierung

Grundsätzlich ist unter anderen Gegebenheiten auch eine Differenzierung einer TH0-Zelle in einen TH1-Lymphozyten möglich, welche eine herausragende Rolle in der Abwehr viraler, aber auch bakterieller oder fungaler Infektionen spielen.

Eine Differenzierung in den TH1-Typ erfolgt in Gegenwart von IL-12, welches über Bindung an seinen Rezeptor auf der naiven TH0-Zelle die Transkriptionsfaktoren STAT4 und in der Folge T-Bet (T-box expressed in T-cells) aktiviert (127). Dies ist Voraussetzung zur TH1-Differenzierung und zur Produktion TH1-definierender Zytokine (104, 115, 44, 74). Eine Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) auf Makrophagen oder dendritischen Zellen bedingt die Sezernierung diverser Zytokine, unter denen IL-12 hier von herausragender Bedeutung ist. Über STAT4 und T-bet werden nun Gene aktiviert, die eine TH1-Differenzierung und die Produktion der TH1-typischen Zytokine IFN-gamma, IL-2 und TNF-beta bedingen (74).

Im Umkehrschluss vermag T-bet die Produktion TH2-typischer Zytokine zu unterdrücken und kann unter bestimmten Voraussetzungen TH2-Zellen in TH1-Zellen umwandeln (127).

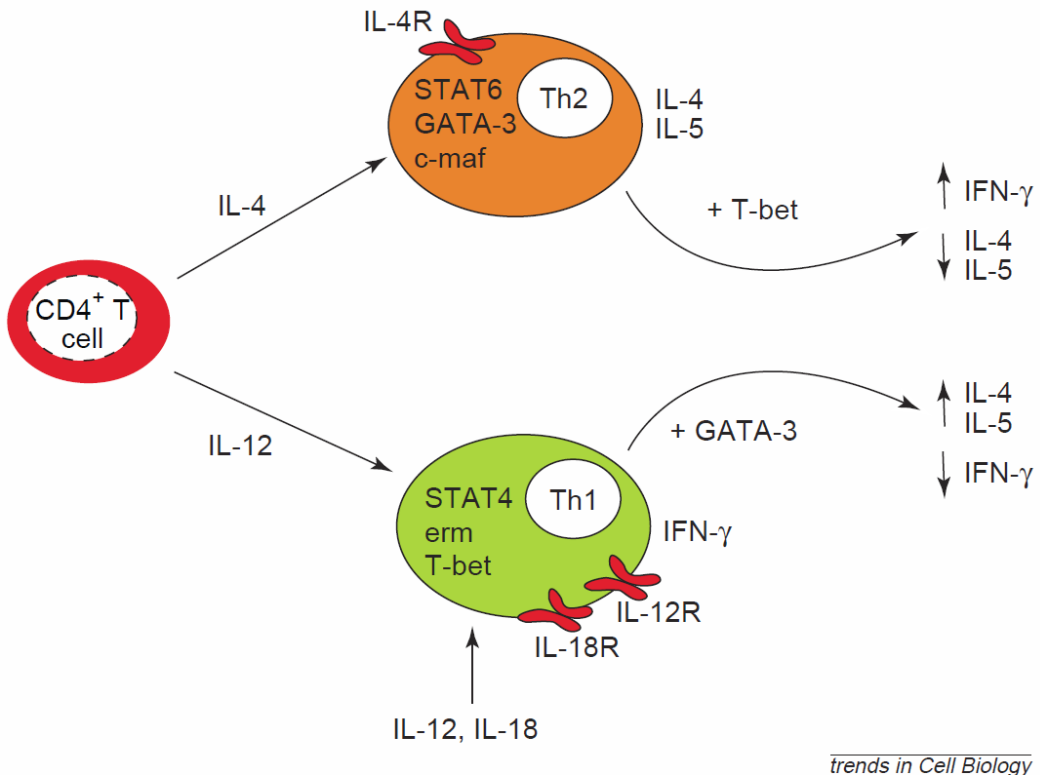


Abb. 1: TH-Zell-Differenzierung, Regulation durch Zytokine und Transkriptions-faktoren. Aus O´Garra et al. (115)

1.4.3.3 Toll-like-Rezeptoren, regulatorische T-Zellen und TH17-Zellen

Die Differenzierung der T-Zellen wird wie beschrieben maßgeblich durch das vorherrschende Zytokinmilieu beeinflusst. In diesem Zusammenhang sind auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) von Bedeutung. Über TLR werden unterschiedliche pathogen-associated molecular patterns (PAMP) erkannt, und in Abhängigkeit davon werden bestimmte Zytokinmuster sezerniert, welche wiederum zur T-Zell-Differenzierung beitragen. Klassischerweise zählen zu den PAMP mikroorganismen-assoziierte Antigene wie Zellwandstrukturen, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharide, Peptidoglycan etc. Unter regelhaften Bedingungen wird nach Aktivierung der APC über TLR ein Zytokinmuster produziert, welches eine TH1-Polarisation zur

Folge hat (IL-12, IL-18, IFN-alpha) oder aber proinflammatorisch wirken. Jedoch gibt es auch TLR-Liganden, die über die Induktion einer IL-10-Produktion eher eine TH2-Polarisation bewirken (96, 127, 6, 43, 115).

Ein weiterer Mechanismus, der in die T-Zell-Differenzierung eingreift, sind sogenannte regulatorische T-Zellen oder auch T-Zell-Populationen, die erst in jüngster Zeit neu entdeckt worden sind, wie die TH17-Zellen (70).

Eine sowohl CD4 und CD25 als auch den Transkriptionsfaktor forkhead box (FOX) p3 exprimierende T-reg-Zell-Population differenziert sich aus naiven TH0-Zellen unter Einwirkung von IL-10 und Interferon-gamma (111, 115). Durch IL-10 und TGF-beta wiederum vermögen sie TH1 und TH2-Zellen zu supprimieren. Sie konkurrieren mit anderen T-Zellen um den Wachstumsfaktor IL-2 und können die Ausdifferenzierung dendritischer Zellen modulieren. Über IL-10 supprimierten T-reg-Zellen die Aktivität von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen und inhibieren einen Isotypenswitch zu IgE in B-Zellen (111, 115).

TH17-Zellen scheinen eine Art Gegenspieler von T-reg-Zellen zu sein. Über IL-17 fördern TH17-Zellen proinflammatorische Prozesse (119, 111, 177).

1.4.4 Effektorzytokine

Die unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen werden definiert über das Spektrum und Muster der von ihnen mehr oder weniger selektiv synthetisierten und sezernierten Zytokine (siehe Tabelle 1a und 1b). TH2-Zellen sind also eine Spezies von Effektor-T-Zellen, die sich über ein Zytokinspektrum definieren, welches insbesondere Interleukin-4, IL-5, IL-9 und IL-13 beinhaltet (56, 73, 162). Die dem gegenüberstehenden TH1-Zellen sind gekennzeichnet vor allem durch die Produktion von Interferon-gamma, jedoch auch IL-2 und TNF-alpha. Zwischen beiden T-Zell-Subpopulationen besteht ein sich gegenseitig inhibierender Zusammenhang. So werden TH-1-Effektor-Mechanismen durch

TH-2-Zytokine supprimiert, eine TH-2-Antwort wird durch TH-1-Zytokine, also insbesondere durch INF-gamma, inhibiert.

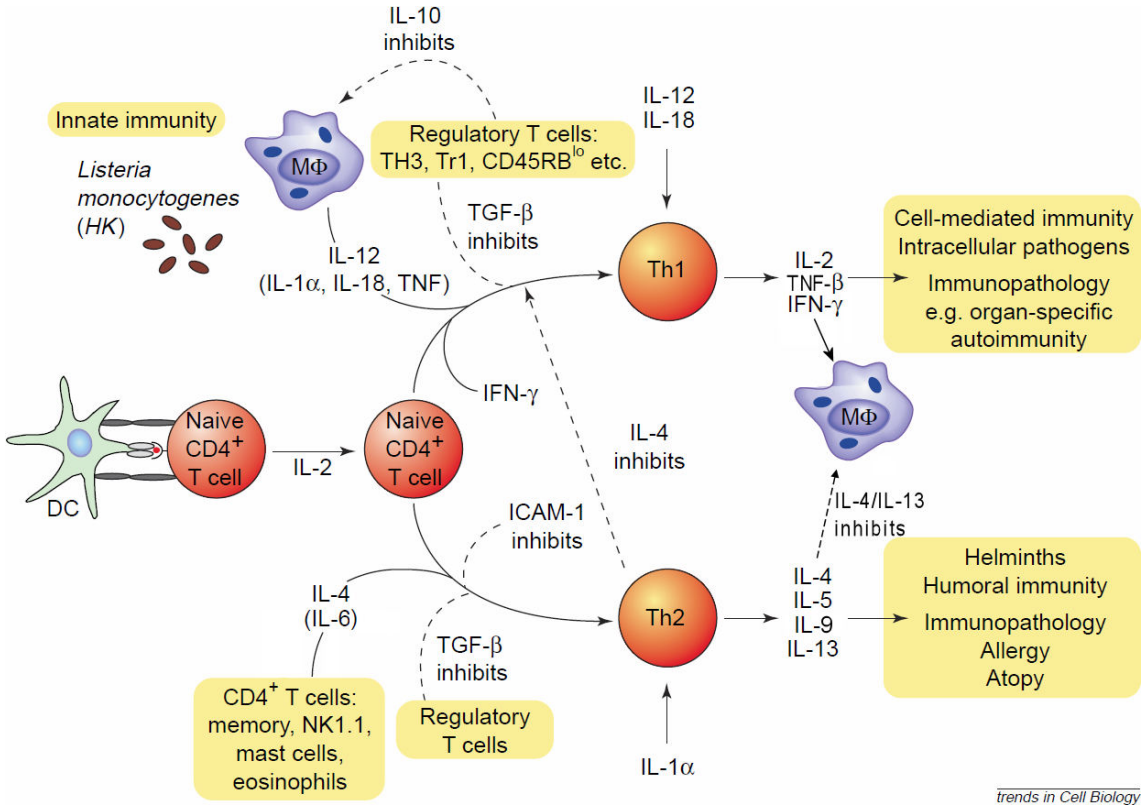


Abb. 2: Dichotomie der TH1/TH2-Entwicklung aus TH0-Zellen vor dem Hintergrund beteiligter Zytokine, aus O´Garra et al. (115)

1.4.5 Die Effektorphase

Im Falle des Asthma bronchiale lässt sich häufig eine durch TH2-Zellen dominierte Immunantwort beobachten (89, 9).

Das vom TH2-Phänotyp produzierte Zytokinspektrum reguliert wesentliche Mechanismen der allergischen Immunantwort, so haben IL-4 und IL-13 eine herausragende Bedeutung bei der Induktion der IgE-Synthese über die Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten hin zu IgE-produzierenden Plasmazellen (IgE-Isotypen-Switch). Pathogenetisch liegt hier eine daraus

folgende Aktivierung von Mastzellen über eine klassische IgE-vermittelte Immunreaktion vom Soforttyp zugrunde (88).

Die im Rahmen des Erstkontakts (Allergenprozessierung und –präsentation über MHC II, T- und B-Zell-Aktivierung, IgE-Isotypenswitch) gebildeten spezifischen IgE-Antikörper binden hochaffine Fcε-Rezeptoren auf eosinophilen Granulozyten und insbesondere auf Mastzellen. Bei einem erneuten Allergenkontakt (Zweitkontakt) degranulieren diese nun nach Kreuzvernetzung der membranständigen Antikörper, was zur Freisetzung von löslichen Entzündungsmediatoren wie Histamin oder Mediatoren aus dem Arachidonsäuremetabolismus wie Prostaglandinen, Leukotrienen oder biogenen Aminen und Proteoglycanen aus präformierten Granula führt. Dies bedingt die allergische Frühphase (88).

Die Mastzellen ihrerseits werden jedoch auch direkt durch TH-2-Zellen reguliert: IL-4 wie auch das neu entdeckte IL-9 haben regulatorischen Einfluss auf Mastzellen.

Die asthmatische Frühreaktion entwickelt sich in nur wenigen Minuten nach Allergenexposition und imponiert klinisch durch eine ausgeprägte Bronchialverengung, die sich in der Regel im Verlauf von ein bis zwei Stunden wieder zurückbildet (88).

In der Spätphase wirken kurzfristig durch IgE-kreuzvernetzte Mastzellen neu synthetisierte Lipide wie Prostaglandine und Leukotriene, welche einerseits stark bronchokonstriktorisch wirken und andererseits die lokale Inflammation unterhalten. Hinzu kommt eine unter anderem durch IL-5 vermittelte Akkumulation von eosinophilen Granulozyten (88).

Darüber hinaus wirkt das die Mast- und B-Zellen aktivierende IL-4 (wie auch das IL-10) hemmend auf die IL-2 und IFN-gamma produzierenden TH-1-Zellen und kann somit die Dominanz einer TH-2-gesteuerten Inflammation aufrecht erhalten. Im Falle einer (hier jedoch unterdrückten) TH-1-Antwort könnte über

eine Synthese und Sekretion von INF-gamma die Proliferation von B-Zellen und die Freisetzung von IgE inhibiert werden (88).

1.4.6 Die Chronifizierung

Ein weiterer Aspekt in einer TH-2 dominierten Effektorantwort ist eine über IL-13 induzierte Becherzellmetaplasie einhergehend mit vermehrter Mucus-Bildung (136) und Fibrose der Atemwege (177). Weitere Konsequenzen schließen die Hyperreagibilität der glatten Muskelfasern (3, 35, 57, 150) sowie letztendlich ein Remodeling (34) ein.

Einen besonders herausragenden Stellenwert in der TH2-Entzündungsantwort haben die eosinophilen Granulozyten. Im Gegensatz zur genannten Frühreaktion ist die asthmatische Spätreaktion durch eine Dominanz eben dieser Zellen gekennzeichnet, die auch langfristig eine Reihe morphologischer Veränderungen induzieren. Via IL-5, welches von den TH2-Zellen freigesetzt wird, kommt es zu einer nachhaltigen Entwicklung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark. Nach einer Akkumulation am Ort des Entzündungsgeschehens im Bronchialgewebe wirken sie über die Freisetzung eines breiten Spektrums an Entzündungsmediatoren. Die Inflammation wird unterhalten durch verschiedene Lipidmediatoren, Zytokine, hochtoxische Mediatoren wie Sauerstoffradikale oder eine Reihe basischer Proteine, wie unter anderem das Major Basic Protein (MBP), das Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN), der Plättchen Aktivierende Faktor (PFA), Prostaglandin E2 (PGE2) und insbesondere das hochtoxische Eosinophile Kationische Protein (ECP). Gerade das ECP als sezernierte, lokal zytotoxisch wirkende Ribonuklease der Superfamilie RNase A zeichnet maßgeblich verantwortlich für eine Zellzerstörung am Ort der Reaktion (70).

Im weiteren Geschehen entstehen T- und B-Gedächtniszellen, welche nun eine schnellere Reaktion auf wiederholte Stimuli ermöglichen und zur Chronifizierung der Erkrankung beitragen.

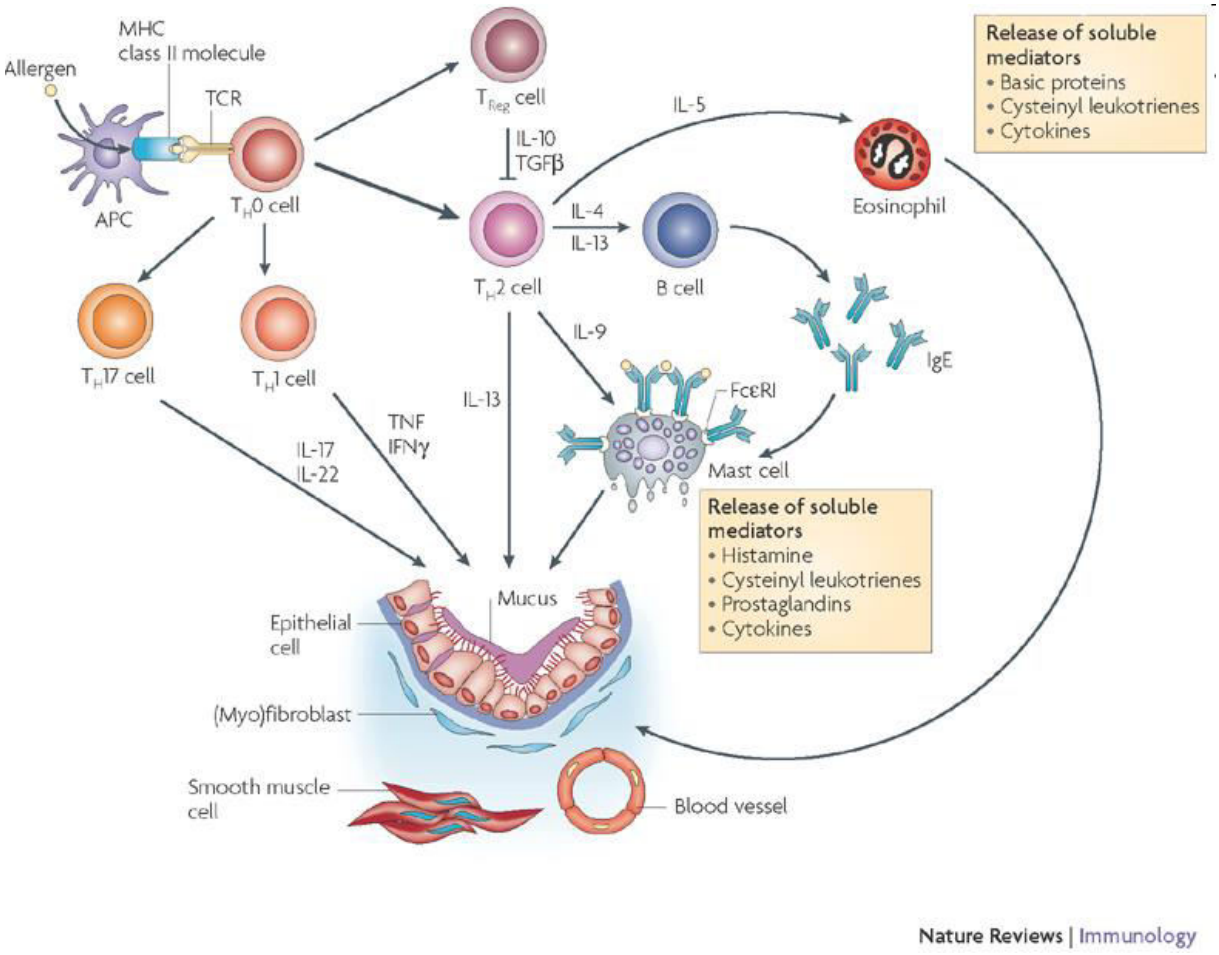


Abb. 3: Mechanismen der Allergie: Das erweiterte Konzept der Pathogenese des Asthma bronchiale, Interaktion und Effekte beteiligter Immunzellen und deren Zytokine. Aus Holgate et al. (70)

Die geschilderten Mechanismen, Effekte und Zusammenhänge bilden die Grundlage für das so genannte Atemwegsremodeling, dem kausal eine von Eosinophilen dominierte Gewebeinfiltration zugrunde liegt. Im Rahmen der durch TH2-Zellen und eosinophilen Granulozyten aufrecht erhaltenen Inflammation kommt es zu einer Zerstörung und Desquamation des

Bronchialepithels, einer Hyperplasie der glatten Myozyten und Drüsenzellen sowie einer Verbreiterung der bronchialen Basalmembran (19, 88).

Folge des chronischen Inflammationsgeschehens ist eine peribronchiale Fibrosierung der Atemwege und die hieraus resultierende Verengung des Atemwegsquerschnitts, die Reduktion der Elastizität der Atemwege und eine Fixierung der Bronchialobstruktion mit persistierender Symptomatik.

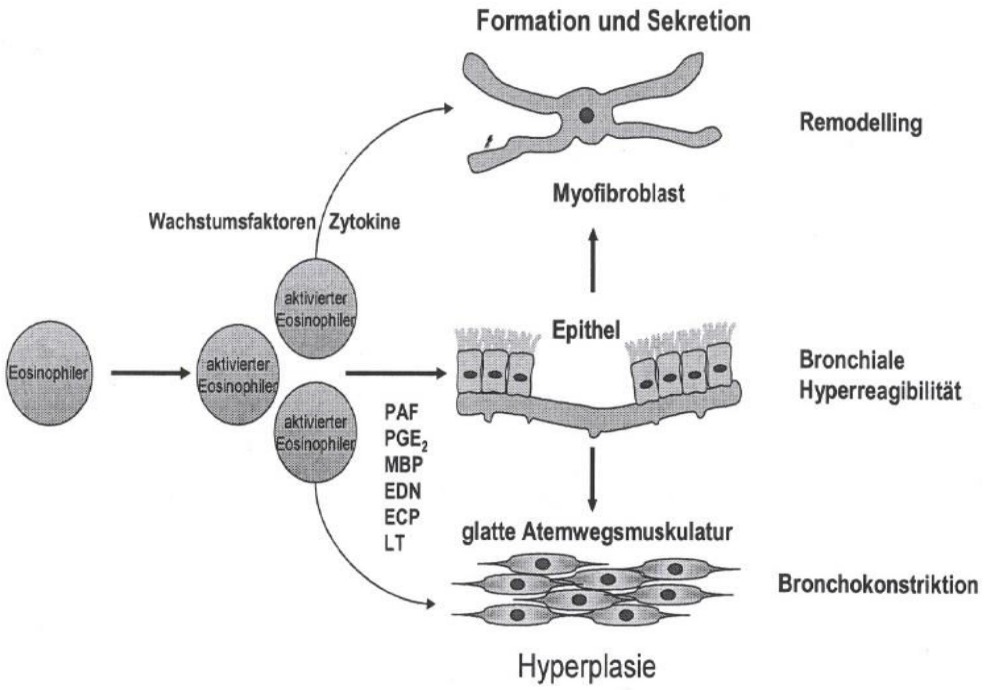


Abb. 4: Rolle des eosinophilen Granulozyten beim Atemwegsremodeling im Rahmen des Asthma bronchiale. Modifiziert nach Williams (161)

Tabelle 1a: wichtige TH1 und TH2 Zytokine und ihre Wirkungen

TH1-Zytokine	**Zytokin- produzierende Zelle**	**Hauptwirkung**
Interferon-gamma	TH1-Lymphozyten, NK-Zellen	- Expression des IL-12-Rezeptors - Inhibierung TH2-Zell-Wachstum und -Differenzierung - Rückdifferenzierung zu TH1 - Induktion von T-bet - Aktivierung von Monozyten und Makrophagen - führt bei B-Zellen zu IgG1 und IgG3 Produktion - in Makrophagen Stimulation von TNF-alpha
TNF-alpha (beta)	TH1-Lymphozyten, Makrophagen	- Beteiligung an lokalen und systemischen Immunreaktionen - Induktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine - Apoptose-Vermittlung bei Tumor-Zelllinien - Proliferation von B- und T-Zellen - bei Autoimmunerkrankungen mitverantwortlich für Gewebedestruktion
IL-2	TH1-Lymphozyten, NK-Zellen	- Anregung von Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten - Stimulation der Produktion anderer Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktoren - Aktivierung zytotoxischer Zellen wie NK-Zellen - in aktivierten Makrophagen Stimulierung von Zytotoxizität

Tabelle 1b: wichtige TH1 und TH2 Zytokine und ihre Wirkungen

TH2-Zytokine	**Zytokin- produzierende Zelle**	**Hauptwirkung**
	TH2-Lymphozyten	Allgemein: allergietypische Erscheinungen wie IgE-Produktion, Präsenz von Eosinophilen, Mucus-Produktion
IL-4	TH2-Lymphozyten	- Polarisierung von CD4+ T-Zellen in Richtung TH2-Phänotyp durch Herunterregulierung des IL-12-Rezeptors - fördert B-Zell-Differenzierung - erhöht MHC-II-Expression (Reaktion auf geringe AG-Konzentrationen) - stimuliert in Plasmazellen Isotypenswitch zu IgE - Inhibierung der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in Makrophagen
IL-5	TH2-Lymphozyten	Wachstumsfaktor zur Rekrutierung, Differenzierung, Entwicklung und zum Überleben von eosinophilen Granulozyten
IL-9	TH2-Lymphozyten	- Differenzierung von Eosinophilen - Förderung der Entwicklung von Mastzellen - Vermittlung von Hyperreagibilität der Atemwege - führt zur Überproduktion von Mucus - unterstützt Isotypenswitch
IL-13	TH2-Lymphozyten	- Erhöhung der MHC-II-Expression auf B-Zellen, - Inhibierung proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen - Stimulierung des Isotypenswitch - bewirkt Hyperreagibilität und pathologisch hohe Schleimproduktion der Atemwege

1.5 Target-basierte Therapieansätze

Die oben ausgeführten Zusammenhänge der mediatorvermittelten Interaktionen im inflammatorischen Geschehen zeigen zumindest in der Theorie vielfältige pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten auf. Insbesondere die löslichen Mediatoren wie Zytokine aber auch spezifische Rezeptoren bieten sich als Target für eine hochspezifische, zielorientierte und targetbasierte therapeutische Intervention an. Denkbar ist unter anderem eine Antagonisierung beteiligter proinflammatorischer Zytokine des TH2-Signalweges oder weiterer Mediatoren bzw. deren Rezeptoren durch monoklonale Antikörper oder aber eine Induzierung anti-allergischer, anti-inflammatorischer Signalwege (z.B. TH1-Effektor-Antworten) durch rekombinante Proteine (z.B. TH1-Zytokine), um anti-allergische Effekte zu vermitteln.

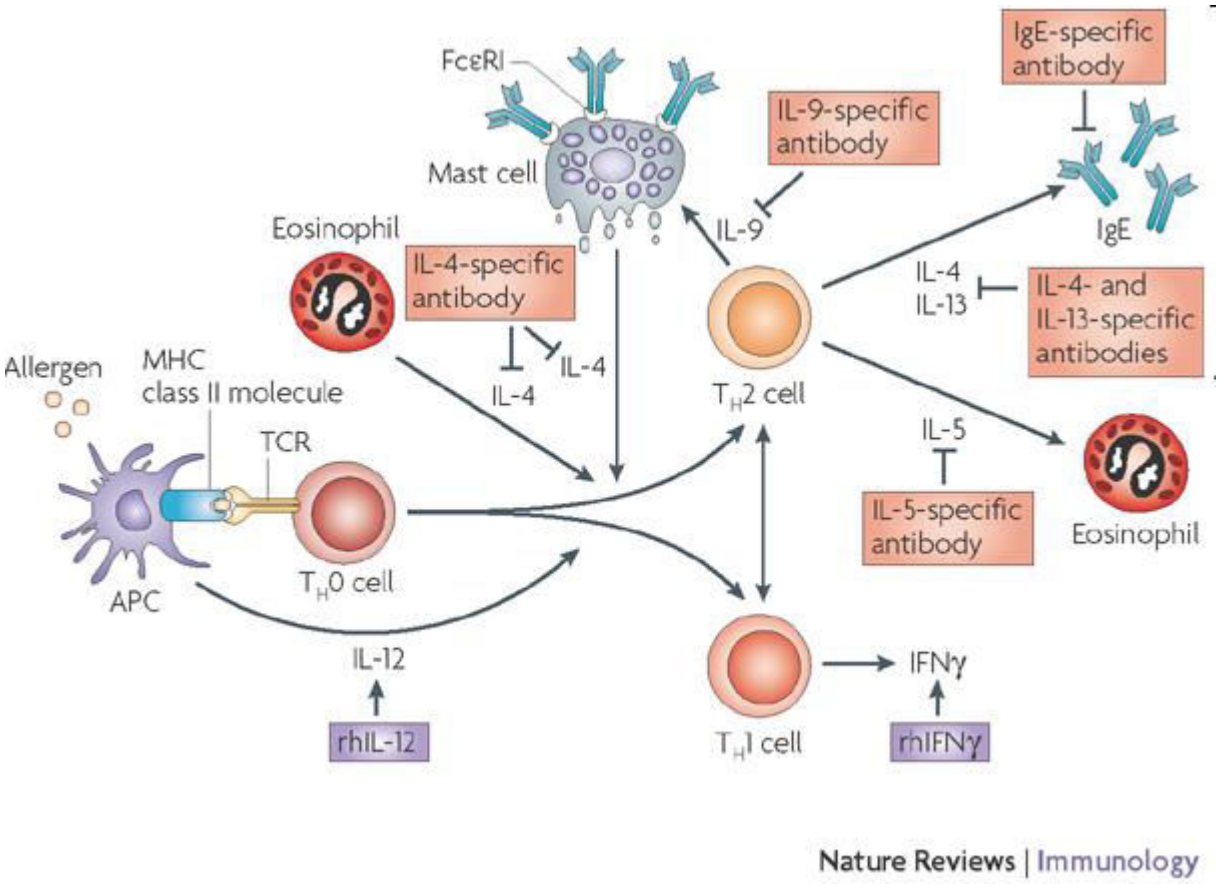


Abb. 5: Ansatzpunkte für potentielle Target-basierte Therapie: Interventionsmöglichkeiten in der Pathogenese durch spezifische Blockade von Zytokinen, Rezeptoren und Antikörpern durch Biologicals. Aus Holgate et al. (70)

Das aus der Grundlagenwissenschaft entwickelte Modell der Pathogenese, welches Asthma nahezu synonym mit einer T-Helfer-2-Zell vermittelten Störung sieht, liefert mit dem Paradigma einer aktivierten TH2-Signalkaskade (sowohl up- als auch downstream) eine Vielzahl potentieller pharmakologischer Targets. Diese Vielzahl setzt sich zusammen aus den klassischen TH2-Zytokinen, jedoch auch aus weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie TNFalpha, IL-1, LTB4, Adhäsionsmolekülen wie VLA-4, CD11a, kostimulierenden Faktoren wie CTLA-4/B7, OX40/OX40L, als auch darüberhinausgehenden weiteren modulatorischen Zyto- und Chemokinen wie CCR3, CCR4, IL-2, TSLP, IL-17, Transkriptionsfaktoren

oder auch anti-inflammatorischen TH1-Zytokinen wie IFN-gamma oder auch IL-10 und IL-12.

In diversen Studien der jüngeren Zeit ist genau dieser Ansatz verfolgt worden und vielfältige potentielle Antagonisten oder Agonisten sind in Phase I und IIa – Studien erprobt worden - mit dem Ergebnis, dass sich lediglich zwei Wirkstoffklassen als erfolgreich durchsetzen konnten, nämlich die Leukotrien-Rezeptorantagonisten und die Antikörper gegen IgE (Anti-IgE). Sämtliche andere Ansätze wurden eingestellt aufgrund vielfältiger Gründe wie z.B. Wirkungslosigkeit, fehlende statistische Signifikanz in randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden klinischen Studien, Auftreten von Nebenwirkungen etc.

Die Blockade oder Manipulation der potentiellen Targets durch beispielsweise monoklonale Antikörper oder antisense-Nukleotide zeigt zwar in verschiedenen Mausmodellen überwiegend hervorragende Wirksamkeit, jedoch unter anderem aus den genannten Gründen keine Übertragbarkeit auf den Menschen (70, 104).

Es stellt sich die Frage, warum die in der immunologischen Theorie plausiblen und in Tiermodellen hervorragend wirksamen Ansätze sich nicht als pathogenetisch orientierte Therapie auf den Menschen übertragen lassen. Eine Antwort könnte die Tatsache geben, dass die möglicherweise oder offensichtlich mehr oder weniger individuelle Relevanz der spezifischen Targets nicht ausreichend in unterschiedlichen Patientenkollektiven validiert wurde. Ein negatives bzw. nicht signifikantes Ergebnis in der Überprüfung der potentiellen therapeutischen Targets bedeutet nicht zwingend, dass das pathogenetische Modell in sich falsch wäre, sondern lässt eben auch die Schlussfolgerung zu, dass es in der Pathogenese interindividuelle Unterschiede im Patientenkollektiv gibt, dass also die pathogenetische Relevanz eines Targets im Gesamtkollektiv der Asthmatiker ungleich verteilt ist. Dies würde bedeuten, dass individuell

differierende Wege der Fehlregulation beschritten werden, wo die Bedeutung in der Pathogenese ein und desselben Targets nicht den gleichen Stellenwert und nicht die gleiche Bedeutung hat. Die Rolle der Targets ist also nicht per se falsch, sondern nur nicht gleichermaßen bedeutsam, wenn unterschiedliche pathogenetische Wege beschritten werden.

Ein Beispiel hierfür bildet jüngst eine Studie (48), die den Effekt von zwei anti IL-13-Antikörpern in der Behandlung des milden bis moderaten Asthma untersucht hat. Es gibt Evidenz, dass Interleukin-13 in der Pathogenese des (allergischen) Asthma eine tragende Funktion innehat. In vitro vermag es diverse Asthma-relevante zelluläre Antworten vermitteln, so wie die IgE-Synthese, Produktion von eosinophilen Chemoattractants, Reifung und Differenzierung von Mucus-sezernierenden Becherzellen und Produktion von extrazellulären Matrixproteinen. Es ist evident, dass IL-13 ein Signal in der Differenzierung von Myofibroblasten darstellt, als auch eine verstärkte Kontraktilität glatter Muskelzellen als Antwort auf Cholin-Agonisten herbeiführt (48).

Die beiden anti-IL-13-Antikörper IMA-638 und IMA-026 sind zwei vollständig humanisierte IgG1 Antikörper, welche an unterschiedliche Epitope des Interleukin-13 binden und dieses zu neutralisieren vermögen (48). Die genannte Studie konnte zeigen, dass die anti-IL-13-Antikörper gegenüber Placebo zwar eine zumindest teilweise signifikante Reduzierung der asthmatischen Früh- und Spätantwort nach Allergenchallenge in Bezug auf die Abnahme des klinischen Parameters forcierte Einsekundenkapazität (FEV1) bewirkten, jedoch blieb der Effekt ausschließlich hierauf begrenzt. Es gab jedoch keinen Effekt weder des einen noch des anderen Antikörpers auf die Atemwegshyperreagibilität gegenüber Metacholin, noch auf die Anzahl der Blut- oder Sputum-Eosinophilen oder die Serum-IgE-Level. Möglicherweise ist der Effekt jedoch systematisch unterschätz worden, wie sich an den folgenden Überlegungen erkennen lässt.

Aus den oben geschilderten Beobachtungen lässt sich die Möglichkeit ableiten, dass im Gesamtkollektiv der Asthmatiker also weitere Subpopulationen existieren, welche differierende Wege in der Pathogenese beschreiten, in der ein Target – in diesem Beispiel das IL-13 - in einem Fall von größerer und im anderen Fall von geringerer Relevanz bzw. pathogenetischer Bedeutung ist. Wenn also innerhalb einer definierten Subpopulation, in der das jeweilige Target eine relevantere Rolle spielt, erneut die Wirksamkeit einer Target-orientierten Therapie überprüft würde, könnte sich hier ein durchaus signifikantes Ergebnis ableiten.

So ist offensichtlich, dass es neben den gemeinsamen pathophysiologischen Reaktionen aller Asthmatiker (Limitation des Atemflusses, Obstruktion, Hyperreagibilität, etc.) eine klinische Heterogenität bezüglich Grad der Schwere der Obstruktion und weiterer Symptome, Grad der Reversibilität, Häufigkeit und Schwere von Exazerbationen, Variationen von Triggerfaktoren, Langzeitfolgen wie Fibrose und Remodeling und insbesondere eine Heterogenität bezüglich des Ansprechens auf Cortikosteroide besteht. So zeigen bis zu 30 – 45% aller Asthmatiker keine Verbesserung der Lungenfunktion unter Therapie mit hochdosierten inhalativen Cortikosteroiden (145, 97) .

Aufgrund der Tatsache, dass es also Responder und Non-Responder auf unterschiedliche Therapieansätze gibt, lässt sich also die Vermutung ableiten, dass es unterschiedliche Subpopulationen oder pathogenetisch orientierte Phänotypen des Asthma gibt. Bekannt und gebräuchlich ist die Einteilung in die an klinischen Kriterien orientierten Phänotypen allergisches und nicht-allergisches Asthma. Darüber hinaus sind weitere eingangs beschriebene klinisch definierte Phänotypen bekannt.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob sich eine Einteilung in (zunächst) zelluläre Phänotypen finden lässt, welche durch immunologische Marker abgebildet werden können, und ob eine Vorselektionierung von

Patienten aufgrund dieser immunologischen Muster zu besseren klinischen Erfolgen bzw. zu einem besseren klinischen Outcome von klinischen Studien führt. Wenn also die potentiellen Responder anhand von immunologischen Markern zuvor selektiert werden könnten, könnte eine Individualisierung und Therapiestratifizierung möglicherweise zu signifikanten Ergebnissen in der klinischen Überprüfung führen, und die Effekte und Wirkungen dieser Target basierten Therapieansätze würden möglicherweise nicht mehr wie bisher systematisch unterschätzt.

Diverse Ansätze zum Verständnis dieser Unterschiede wurden mit dem Ziel verfolgt, aufgrund des jeweiligen Asthma-Phänotyps nicht nur prognostische Aussagen treffen zu können, sondern auch einen Responder bezüglich der neu entwickelten oder zu entwickelnden Target-basierten Therapeutika bzw. Zytokin-basierten Biologicals zu identifizieren (14).

1.6 Zelluläre Phänotypen

Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im induzierten Sputum stellt ein adäquates Kriterium zur Differenzierung zellulärer Phänotypen dar; ebenso wie auch die Anzahl der Neutrophilen im Sputum als ein weiteres differenzierendes Kriterium gesehen werden kann. Die Einteilung in ein eosinophiles (eosinophile Granulozyten im Sputum > 1,9%) und ein nicht-eosinophiles (eosinophile Granulozyten im Sputum < 1,9%) Asthma korreliert zwar nicht mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung, zeigt jedoch unterschiedliche qualitative klinische Ausprägungen und im Besonderen ein differierendes Ansprechen auf Therapie. Nicht eosinophiles Asthma findet sich bei 25% der Patienten ohne Therapie und bei ungefähr der Hälfte der Patienten unter (Steroid-) Therapie (59).

Durch die zellulären Marker Eosinophile und Neutrophile im induzierten Sputum lassen sich demzufolge vier zellulär definierte Klassifikationen unterscheiden,

nämlich ein eosinophiler Typ, ein neutrophiler Typ, ein gemischtzelliger Typ sowie ein pauci-granulozytärer Typ (Abwesenheit von Granulozyten). (59, 63, 123).

Tabelle 2: Vier zelluläre Phänotypen. Der relative Anteil von Eosinophilen und Neutrophilen im induzierten Sputum definiert vier zelluläre Phänotypen mit Korrelation zu klinischen Parametern. Haldar P, Pavor ID. (59)

	Nicht-eosinophil (< 1.9 %)	**Eosinophil (> 1.9 %)**
Normale Neutrophile (< 61 %)	**Paucigranulocytär** - **Kontrolliert oder intermittierend** - **Ggf. andere Diagnose**	**Eosinophil** - **Allergisches Asthma** - **Inadäquate ICS Therapie**
Erhöhte Neutrophile (> 61 %)	**Neutrophil** - **Akute Infektion (bakteriell oder viral)** - **Chronische Infektion (Chlamydien, Adenoviren)** - **Raucher** - **Ozon, NO2** - **Endotoxine** - **Berufsbedingt** - **Adipositas**	**Gemischte Granulozyten** - **(schwere) Asthmaexazerbation** - **Therapierefraktär**

Ein Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Eosinophilie zeigte, dass nicht-eosinophiles Asthma schlecht auf den Goldstandard, nämlich die Behandlung mit inhalativen Cortikosteroiden, ansprach (121, 54). Bei schweren Ausprägungsgraden geht nicht eosinophiles Asthma einher mit einem schlechteren FEV1, weniger Mastzellen und weniger subendothelialer Fibrose (158).

Eosinophilie wird häufig gesehen im klassischen atopischen Asthma mit Allergen-vermittelter Entzündung und zeigt – ausgenommen sehr schwere Verläufe – ein gutes Ansprechen auf inhalative Cortikosteroide (59, 158, 40, 11, 21, 50).

Im Gegensatz hierzu ist das neutrophile Asthma (neutrophile Granulozyten im Sputum > 61%) assoziiert mit akuten und chronischen Infektionen, Adipositas, Tabak-Rauchen, schwerem Asthma und häufigeren Asthma-Exazerbation, sowie einer Exposition von Umweltgiften (59, 158, 40). Neutrophilie geht einher mit einer reduzierten Lungenfunktion gemessen anhand der forcierten Einsekundenkapazität (FEV1).

Gemischtzellige Phänotypen werden beobachtet in refraktären Verläufen einhergehend mit der schlechtesten Lungenfunktion und der höchsten Exazerbationsfrequenz. Mehrere Studien konnten zeigen, dass mit abnehmender Eosinophilenzahl auch das Ansprechen auf Cortikosteroide abnimmt (59, 63).

Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass eine Inhibierung eines Signalweges, welcher zu einer Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten führt, eher bei einem zellulären Subtyp, der durch die Wirkung von Eosinophilen vermittelt und getragen wird, zu einem signifikant positivem Ergebnis führt und eben nicht bei einem neutrophilen oder pauci-granulozytären Typ.

In unselektionierten Kollektiven von Asthma-Patienten hat - wie oben beschrieben das aus der Grundlagenwissenschaft entwickelte Paradigma der TH2-Entzündungsantwort vorausgesetzt (104) - die Testung von Antikörpern gegen Interleukin-5 – analog zu diversen anderen potentiellen Therapietargets wie weiteren TH2- oder proinflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen oder costimulierenden Faktoren - kein signifikantes Ergebnis in Bezug auf vor allem klinische Parameter wie beispielsweise Atemwegshyperreagibilität

gegenüber der Placebo-kontrollierten Kontrollgruppe erbracht. Die wissenschaftliche Rationale liegt beim Einsatz von Anti-IL-5-Antikörpern in der zentralen Funktion des IL-5 bei der Induktion und Aktivierung eosinophiler Granulozyten.

Nach vorhergehender Stratifizierung der Patienten und der Selektion anhand zellulärer Phänotypen (eosinophiles Asthma, Eosinophile im Sputum > 3%) konnten Studien nachweisen, dass der Focus auf dieses Target (IL-5) in einem selektionierten Patientengut (eosinophiles Asthma) ein signifikantes positives Ergebnisse in Bezug auf die Wirksamkeit gegenüber Placebo erbrachte (104, 63).

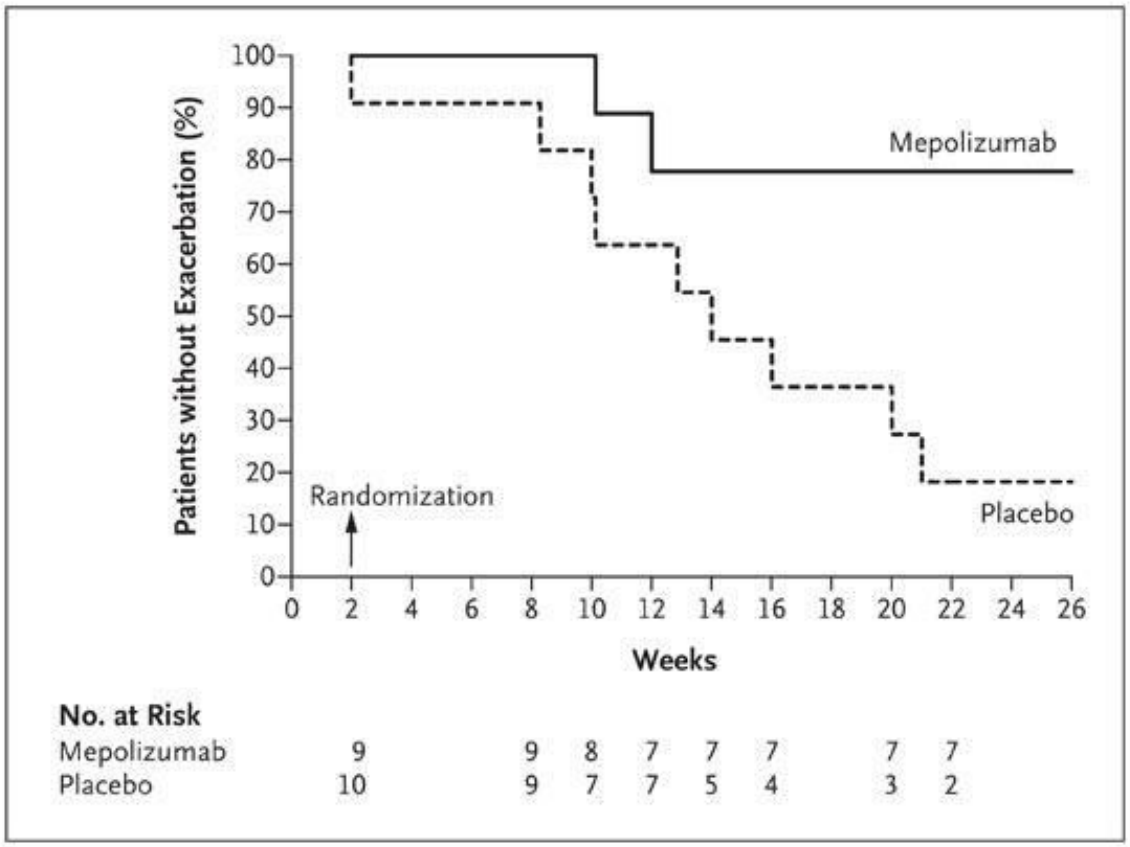


Abb. 6: Therapie mit monoklonalen anti-IL-5-Antikörpern (Mepolizumab) verringert in einer Subgruppe von Asthmatikern signifikant die Rate an Exazerbationen; Nachweis durch doppelblinde, randomisierte, Placebo kontrollierte Studie über 26 Wochen. Aus Nair et al (109).

Patienten mit schwerem Asthma vom eosinophilen Typ (Eosinophile im Sputum > 3%), welche trotz oraler Steroide noch eine ausgeprägte Eosinophilie im Sputum aufwiesen, zeigen unter Behandlung mit monoklonalen Anti-Interleukin-5-Antikörpern nun eine signifikante Besserung (109).

Analog zeigen Patienten mit schwerem steroidrefraktärem eosinophilen Asthma (Eosinophile im Sputum > 3% trotz inhalativer oder oraler Steroidgabe) und rezidivierend schweren Exazerbationen eine signifikante Wirkung unter Therapie mit Anti-IL-5-Antikörpern (58).

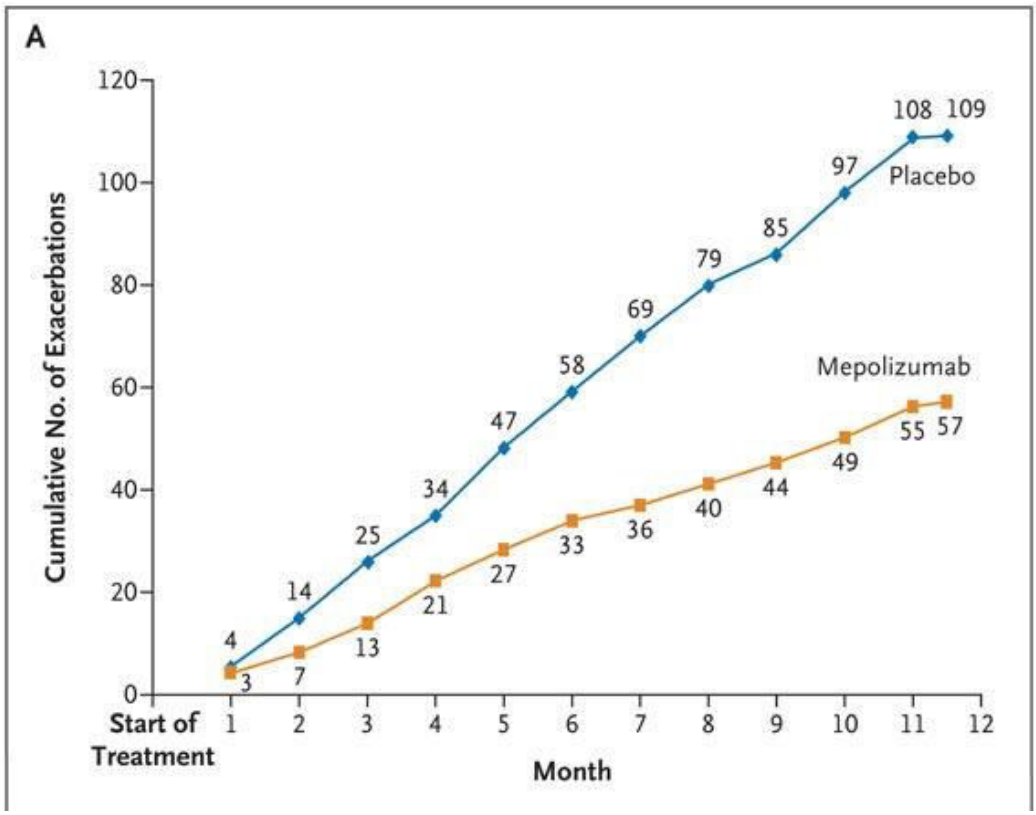


Abb. 7: Therapie mit monoklonalen anti-IL-5-Antikörpern (Mepolizumab) verringert in einer Subgruppe von Asthmatikern signifikant die Rate an Exazerbationen; Nachweis durch doppelblinde, randomisierte, Placebo kontrollierte Studie über 12 Monate. Aus Haldar et al. (58)

Dies kann als Bestätigung der Annahme gesehen werden, dass unter bestimmten Gegebenheiten ein spezifischer, stratifizierter Therapieansatz bei dafür selektionierten Patienten zu klinischen Erfolgen führen kann.

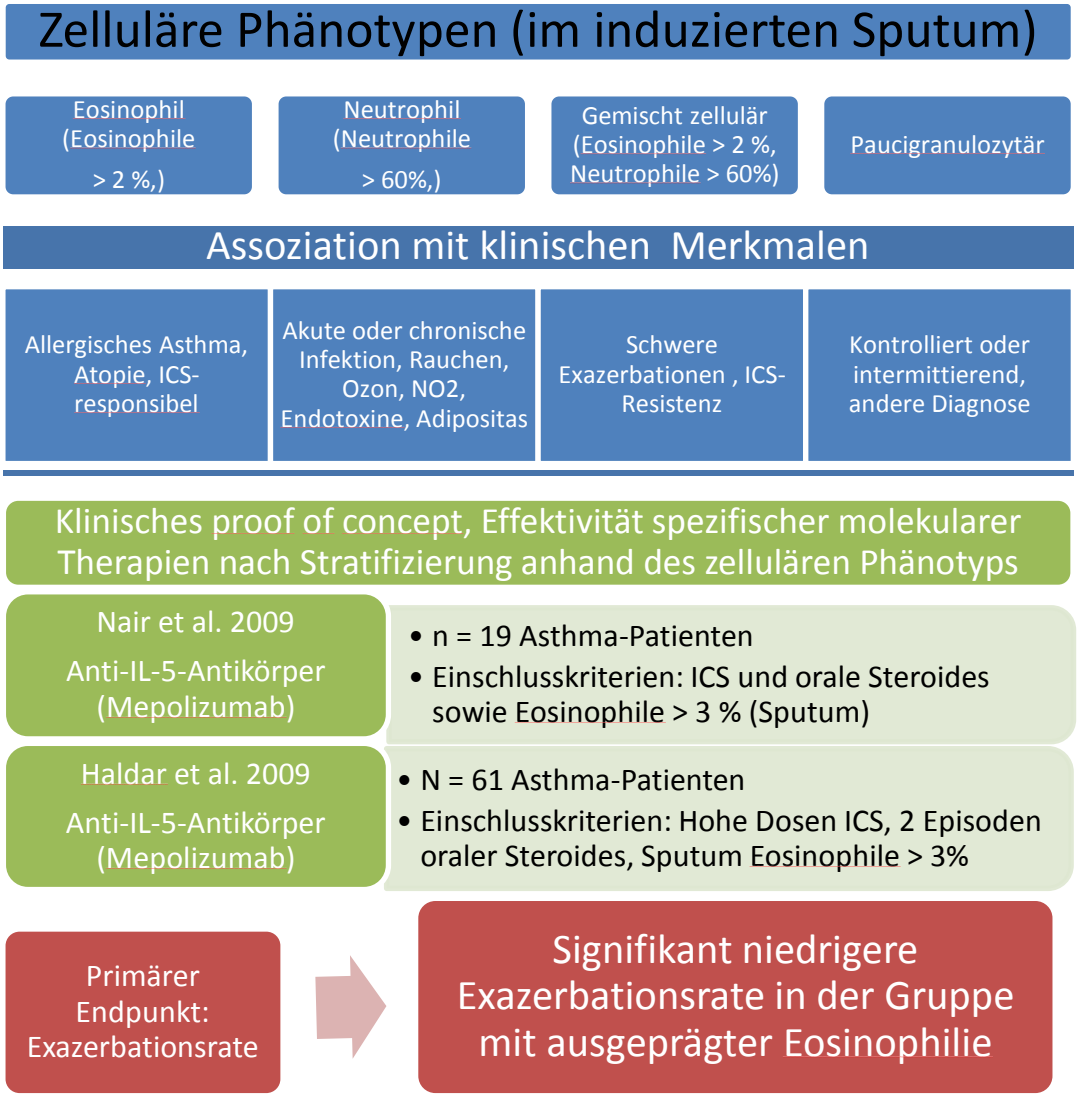


Abb. 8: Zytologische Phänotypen, Assoziation zu klinischen Phänotypen, Proof of concept: spezifische zelluläre Phänotypen sprechen auf anti-IL-5-Therapie an.

1.7 Molekular-immunologische Phänotypisierung

1.7.1 molekulare Phänotypen

Die Tatsache, dass es offensichtlich unterschiedliche (zunächst zelluläre) Phänotypen bzw. (zelluläre) Subpopulationen im Gesamtkollektiv der Asthmatiker gibt, lässt die Schlussfolgerung zu, dass offensichtlich unterschiedliche Signalwege in der Pathogenese beschritten werden.

Zur Entwicklung neuer pharmazeutischer Targets ist es also notwendig, diese Signalwege zu kennen beziehungsweise die jeweilige Subpopulation, in welcher der spezifische Signalweg beschritten wird, zu identifizieren und von anderen zu unterscheiden, damit der Target-basierte therapeutische Ansatz überhaupt signifikant wirken kann. Zum Zwecke der Therapiestratifizierung und einfachen Identifizierung von potentiellen Respondern unterschiedlicher Therapieansätze müssten Biomarker etabliert werden können, welche unproblematisch und kostengünstig zu gewinnen sind. Dieser Aufgabe könnten Plasmaproteine gerecht werden.

Unter anderem vor diesem Hintergrund sind weitere Studien zu sehen, welche versuchen, die Einteilung der verschiedenen Subpopulationen nicht anhand von klinischen oder demographischen multivariaten Clusteranalysen oder anhand der oben beschriebenen aufwendigen zytologischen Untersuchungen im induzierten Sputum vorzunehmen, sondern noch einen Schritt weiter gehen als die bislang vorausgegangenen klinischen oder zytologischen Phänotypisierungen (8).

Anhand von molekular-immunologischen Phänotypisierungen konnte eine Veränderung der Genexpression nachgewiesen und nachvollzogen werden, deren Genprodukte möglicherweise die Fähigkeit besitzen, die von brauchbaren Biomarkern gefordert wird.

Mehrere Studien haben hier deutliche Fortschritte bezüglich des Verständnisses der Heterogenität auf molekularbiologischer Ebene durch die statistische Methode des *Unsupervised Hirachical Clustering* die Genexpression betreffend erbracht. Dieser Ansatz beinhaltet zunächst die Anwendung von Micro-Arrays zur Bestimmung der jeweiligen Genexpression im Sinne von Herauf- oder Herabregulierung sämtlicher auf den Arrays abgebildeter Gene, und die daran anschließende statistische Auswertung, um Cluster, Muster und Profile zu erkennen.

In einer Studie von Baines et al. (8) wurde dieser Ansatz verfolgt, der mittels Genanalyse eine Phänotypisierung auf einem transkriptionalen Level vornimmt. Aus induziertem Sputum von erwachsenen Asthma-Patienten wurde mRNA extrahiert und hieran die Genexpression untersucht, also die Herauf- oder Herunterregulation unterschiedlichster Gene. Die Genexpressionsanalysen wurden mittels eines Gen-Arrays durchgeführt, auf welchem mehrere tausend Gene abgebildet sind. Folgende Fragen sollten beantwortet werde: Welche Gene sind es, die einer veränderten Expression zugrunde liegen, welchen Kategorien lassen sie sich zuordnen und vor allem lassen sich durch Hierarchisches Clustering molekularbiologische Phänotypen identifizieren, welche möglicherweise sogar einem klinischen oder zellulären Phänotyp entsprechen. Die Anwendung von Whole-Genome-Gene-Expression Microarrays erbrachte, dass insgesamt 330 Gene bei den Probanden differentiell exprimiert wurden.

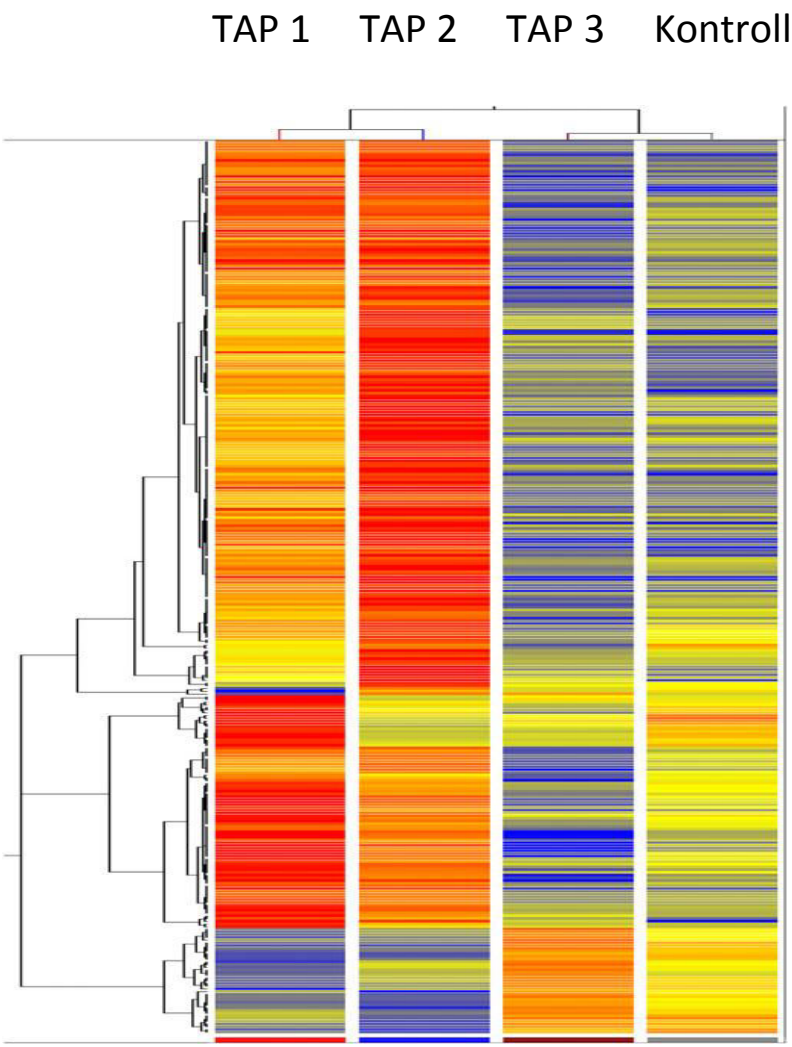


Abb. 9: Hierarchisches Clustering basierend auf Transkriptomanalysen aus induziertem Sputum identifiziert drei verschiedene Translationale Asthma Phänotypen, diese molekularen Signaturen sind assoziiert mit klinischen Asthmaphänotypen. Heat map dendrogram der 330 unterschiedlich exprimierten Gene: blau repräsentiert ein niedrigeres Level der Expression, rot ein höheres. Aus Baines et al. (8)

Durch statistische Analyse und das Verfahren des Unsupervised Hierarchical Clustering konnten drei Subgruppen identifiziert werden.

Der erste *Translationale Asthma Phänotyp* (TAP1) zeigt im Vergleich mit klinischen und zellulären Befunden ein erniedrigtes prozentuales FEV1, hohe FeNO-Werte (Fraktion des exhalierten Stickstoffmonoxyds) sowie einen hohen

Anteil an Eosinophilen im Sputum. TAP 2 zeigt unter Berücksichtigung klinischer und zytologischer Informationen ebenfalls erniedrigte prozentuale FEV1-Werte, jedoch eine hohe Sputum-Neutrophilie. TAP3 lag im Abgleich mit zuvor erhobenen Parametern inflammatorisch im Bereich der gesunden Kontrollen mit einer leicht erhöhten Anzahl von Makrophagen im Sputum. Es zeigten sich also Korrelationen und Parallelen der molekularen Phänotypen durch Gen-Array-Analyse und Hierarchischem Clustering mit zuvor beschriebenen klinischen und zellulären Subpopulationen. Tap 1 scheint assoziiert zu sein mit erhöhter Eosinophilie, TAP 2 ist assoziiert mit einem neutrophil dominierten Zelltyp und TAP 3 gibt in etwa den paucigranulozytären und gemischtzelligen Typ wieder (8).

Eine genauere Betrachtung der unterschiedlich exprimierten Gene ergab eine Zuordnung zu Kategorien von Genen, die involviert sind in Immunität, Entzündung, (Infekt-) Abwehr, Chemotaxis, Wachstum (Proliferation und Wundheilung). Neben einer Immun- und Entzündungsrelevanz zeigten sich Gene bestimmter Signalwege überrepräsentiert wie beispielsweise des TNF-alpha - NF-kappaB-Signalwegs (8).

So offenbarte sich eine Heraufregulation bestimmter Gene des IL-1 und TNF-alpha/NF-kB-Signalweges im neutrophilenreichen TAP2; TAP1 hingegen zeigte eine hohe Eosinophilie und repräsentiert somit auch im Abgleich mit klinischen Parametern den eosinophilen Zell-Phänotyp. TAP 3 korreliert mit dem paucigranulozytären Phänotyp sowie den gesunden Kontrollen. (8)

Die drei unterschiedlichen transkriptionalen Phänotypen sind somit assoziiert mit wichtigen Unterschieden die klinischen und zellulären Asthma-Phänotypen betreffend, sie repräsentieren wichtige Unterschiede in Bezug auf die dominierenden Entzündungszellen und die beschrittenen inflammatorischen Signalwege (8).

Molekulare Phänotypen

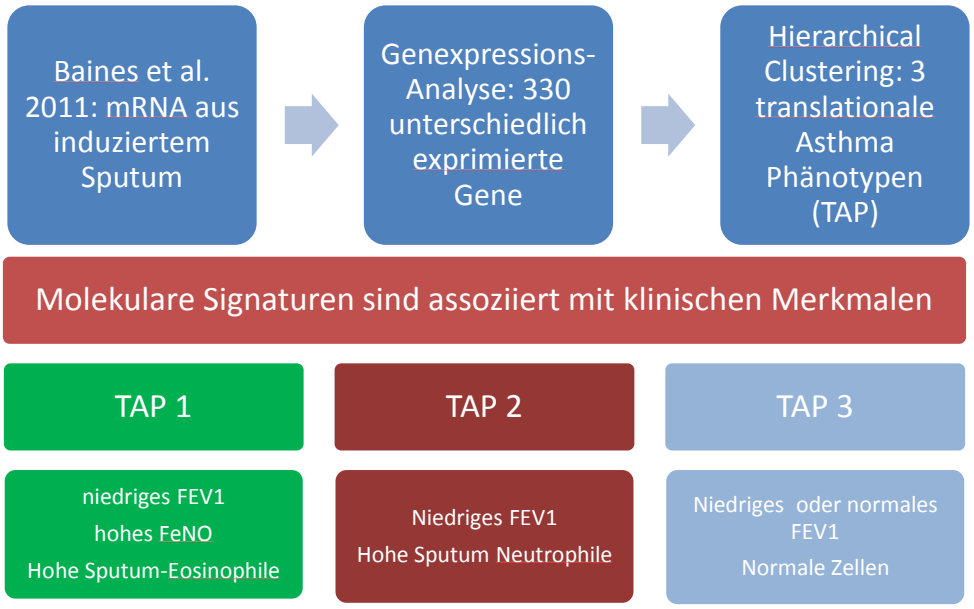


Abb. 10: Definition von drei translationalen Asthmaphänotypen

1.7.2 Surrogatmarker einer TH2-Enzündung durch Genom-wide-profiling

Da zu Recht angenommen werden kann, dass viele der letztendlich im Sputum gemessenen Parameter epithelialen Ursprungs sind, wurden, um die epitheliale Zell-Dysfunktion und deren Ansprechen auf Steroide näher zu untersuchen, in zwei Studien (164, 165) von Woodruff et al. Epithelzellen bronchoskopisch durch sogenanntes *Epitheliales Airway-Brushing* gewonnen. Es wurden leichte bis mittelschwere Asthmatiker, Raucher und gesunde Kontrollen sowohl vor als auch nach einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden Behandlung mit inhalativen Steroiden untersucht. Im Speziellen lag der Focus auf der Analyse der Genexpression in den unterschiedlichen Gruppen. Aus den bronchoskopisch gewonnenen Epithelzellen wurde mRNA isoliert und mittels Genom-weitem Profiling durch Microarrays konnte eine systematische Analyse der Genexpression im Sinne von Herauf- oder Herabregulation vorgenommen werden.

Schließlich wurde in Zellkultur anhand von humanen bronchialen Epithelzellen die Expression der gefundenen überexprimierten Gene nach Exposition gegenüber IL-13 und nach Behandlung mit Steroiden untersucht.

Die Expressions-Analyse in den gewonnenen Epithelzellen führte zur Identifikation eines Panels von unterschiedlich exprimierten Genen, welche sich als überexprimiert sowohl gegenüber gesunden Kontrollen, Rauchern und mit Steroiden behandelten Asthmatikern herausstellten.

Unter den am stärksten induzierten Genen fanden sich

- Cloride channel, calcium activated, family member 1 (*CLCA*1): 6,2fach
- Periostin (*POSTN*): 4,4 fach
- Serine peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (*SerpinB*2) auch bekannt als plasminogen activator inhibitor-2 (*PAI* 2): 3,5 fach

Weiterhin wurde eine Überexpression von drei Mastzellmarkern gefunden: Carboxypeptidase A3 (3,4 fach induziert), Tryptase beta 2 (2,2 fach) und Tryptase alpha/beta2 (2,1 fach).

Eine nähere Beschreibung der Gene bzw. Genprodukte siehe unten.

Es erfolgte eine Bestätigung der Genexpression mittels quantitativer real-time-PCR sowie der Proteinexpression in den epithelialen Brushings mittels Immunhistochemie (Periostin) und in der gleichzeitig gewonnenen bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit mittels ELISA (PAI 2).

Um einen Effekt von Cortikosteroiden auf die Regulation dieser Gene nachzuweisen, wurden nach einer Fluticason- oder Placebo-Behandlung der Probanden erneut bronchoskopische Proben genommen und Analysen mittels Microarray und PCR durchgeführt, welche nun eine signifikante Herabregulierung der fraglichen Gene nach Cortikosteroid-Behandlung nachweisen konnten (164, 165).

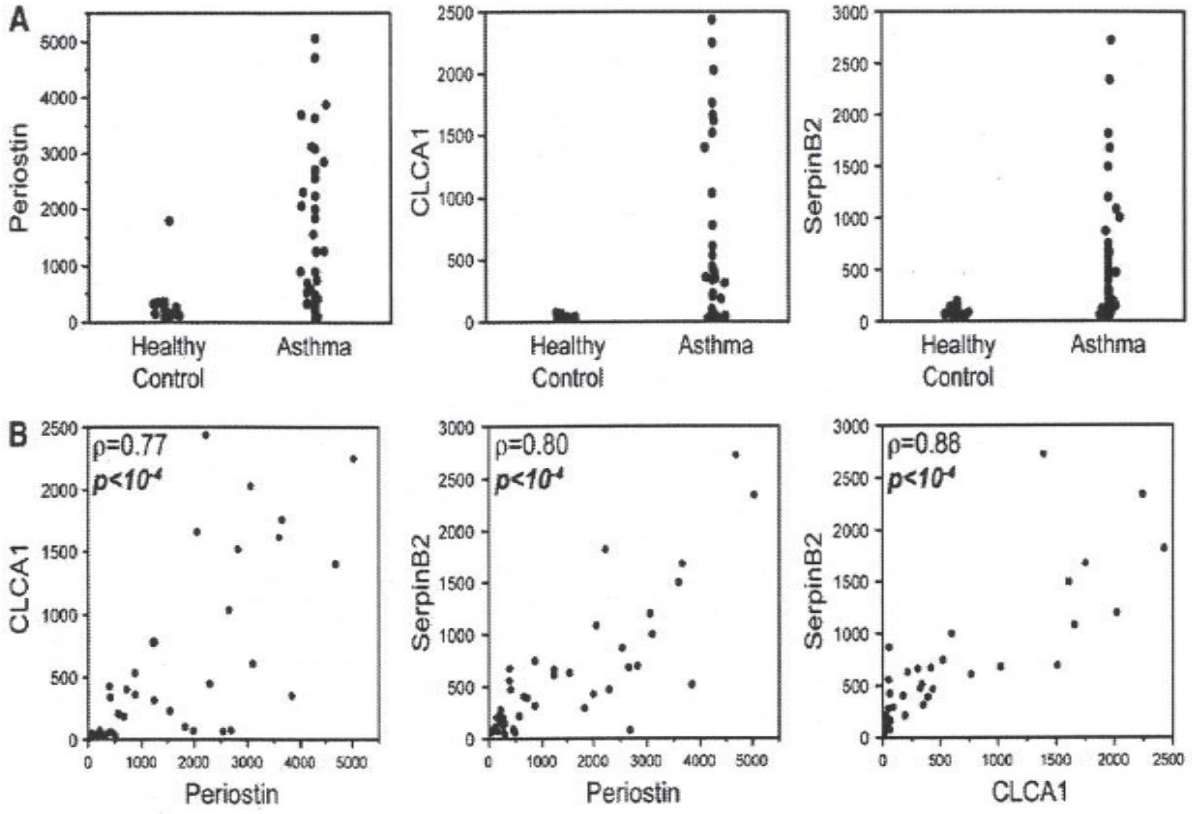


Abb. 11: A: Expressions-Level von drei IL-13 induzierbaren Genen aus epithelialen Brushings unterscheiden zwei Asthma-Subgruppen. B: Two-Way Vergleich der Expressions-Level, Korrelation durch Spearman´s rank order correlation und p-Werte angegeben. Aus Woodruff et al. (165)

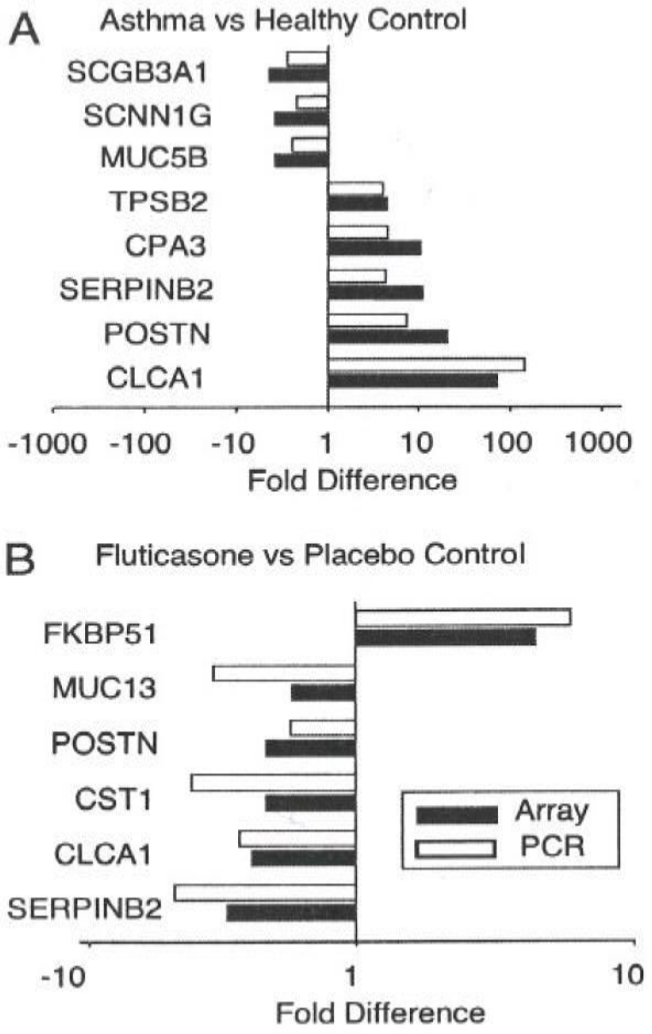


Abb. 12: A: PCR-Validation der durch Micro-Array detektierten differentiell exprimierten Gene. Signifikant höhere Expression in Asthmatikern gegenüber gesunden Kontrollen. B: Genexpression reagiert auf Steroidbehandlung. Signifikant niedrigere Expression gegenüber Placebo-Kontrolle. Aus Woodruff et al. (164)

Weiterhin wurde der in-vitro Effekt von einerseits Interleukin-13 und andererseits von Steroiden auf humane respiratorische Epithelzellen in Zellkultur untersucht, mit dem Ergebnis, dass IL-13 die fraglichen Gene induzieren kann, während Dexamethason diesen Effekt wieder auf zu heben bzw. eine Expression zu hemmen vermag.

Es gibt insofern Evidenz, dass alle drei Gene direkt über Interleukin-13 aber auch, wie durch weitere Studien belegt werden konnte, ebenfalls durch IL-4 reguliert werden. Somit können also zunächst drei Gene identifiziert werden, deren Heraufregulation als Surrogatmarker für eine durch TH2-Zytokine getriebene Inflammation der Atemwege gesehen werden kann (48, 146).

1.7.3 TH2-hoch und TH2 niedrig Phänotypen, das Konzept der TH2-Endotypen

Basierend auf der Erkenntnis, dass die Gene *POSTN, CLCA*1 und *SERPIN*B2 bzw. deren Genprodukte als mögliche Surrogatmarker für eine TH2 gesteuerte Immunantwort dienen können, untersuchten Woodruff et al. (164, 165) inwiefern diese Gen-Signatur helfen kann, Subpopulationen von Patienten zu identifizieren, welche sich in Bezug auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Inflammation von anderen Subpopulationen unterscheiden. Hierzu wurden zunächst die Daten der vorangegangenen Studie (siehe oben) mit dem Ergebnis reanalysiert, dass jedes dieser drei Gene in nur einer Teilmenge und nicht in allen Asthma-Probanden überexprimiert ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Marker einer TH2-Inflammation nur in einer Subpopulation von Asthma-Patienten zu finden sind. Um diese Subpopulation zu definieren, wurden die Ergebnisse der Gen-Array-Untersuchungen einem Unsupervised Hierarchical Clustering basierend auf dem Expressionslevel der Gene *POSTN*, *CLCA*1 und *SERPIN*B2 unterzogen. Annähernd die Hälfte der Probanden zeigte nach wie vor eine hohe Expression der TH2-induzierten Gene, während die andere Hälfte eine normale Expression aufwies. Beim Vergleich aller Probanden mit den gesunden Kontrollen hatte sich zunächst eine allgemeine Überexpression der drei Gene gezeigt, während nun nach der hierarchischen Clusteranalyse in etwa die Hälfte der Erkrankten anhand der Surrogatmarker nicht mehr von den gesunden Kontrollen zu unterscheiden

waren. Es bilden sich zwei Cluster ab, wobei in Cluster 1 die Marker *POSTN*, *CLCA*1 und *SERPIN*B2 stark heraufreguliert sind, was in Cluster 2, welches die andere Hälfte der Patienten sowie die gesunden Kontrollen repräsentiert, nicht der Fall ist.

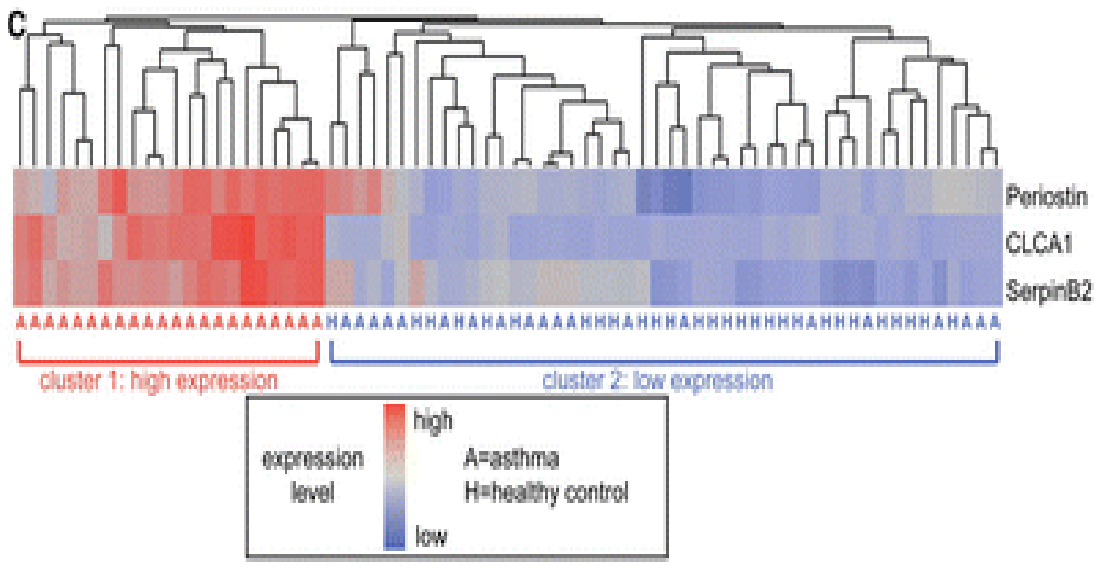


Abb. 13: Heatmap-Dendrogram durch Unsupervised Hierarchical Clustering von *Periostin*, *CLCA*1 und *Serpin* B2 aus bronchialen Epithelzellen definiert zwei Cluster. Cluster 1 mit hohen Expressionsleveln besteht ausschließlich aus Asthma Patienten (TH2-hoch), Cluster 2 mit niedrigen Expressionsleveln setzt sich zusammen aus Patienten (TH2-niedrig und gesunden Kontrollen). Aus Woodruff et al. (165)

Um die Validität zu untermauern, wurde mittels PCR die Expression der Interleukine 4, 5 und 13 in den Bronchial-Biopsaten quantifiziert mit dem Ergebnis, dass im ersten Cluster, also der Gruppe mit hohen Surrogatmarkern (*POSTN*, *CLCA*1 und *SERPIN*B2) auch IL4, IL5 und insbesondere IL-13 stark heraufreguliert waren - im Gegensatz zu den Patienten im Cluster Zwei. Diese Patienten unterscheiden sich offensichtlich nicht in Bezug auf die Expression von TH2-Zytokinen gegenüber Gesunden.

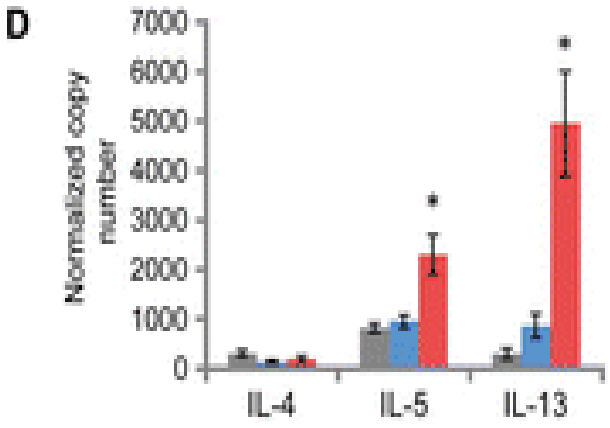


Abb. 14: Mittlere Expressionslevel von IL-4, IL-5 und IL-13 in bronchialen Epithelien. Überexpression in Cluster 1 (rote Balken, TH2-hoch), geringere Expression in Cluster 2 (blaue Balken: TH2-niedrig-Asthmatiker, graue Balken: gesunde Kontrollen). Aus Woodruff et al. (165)

Vor diesem Hintergrund können zwei molekulare Phänotypen von Asthmatikern unterschieden werden. Ein Phänotyp, in welchem eine strak heraufregulierte TH2-Zell-Antwort gesteuert durch die typischen TH2-Zytokine und gemessen an den Surrogatmarkern *POSTN*, *CLCA*1 und *SERPIN*B2 zu finden ist, und ein Phänotyp in dem kein Bezug zu einer TH2-Antwort zu finden ist. So lassen sich ein „TH2-hoch“ und ein „TH2-niedrig“ molekularer Phänotyp definieren. Dies beweist, dass die Population der Asthmatiker auch auf molekularer Ebene heterogen ist.

Vor diesem Hintergrund wird zur näheren Beschreibung bzw. Definition des „molekularen Phänotypen“ der Begriff des Endotypen eingeführt. Der Endotyp stellt gleichsam die Verbindung vom Genotypen zum klinischen Phänotypen dar und beschreibt einen spezifischen molekularbiologischen Signalweg, welcher letztendlich im klinischen Phänotypen mündet. Der TH2-Endotyp entspricht somit dem molekularen TH2-hoch-Phänotyp.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeichneten sich beide Phänotypen TH2-hoch sowie TH2-niedrig bzw. ein TH2-Endotype und ein non-TH2-Endotyp durch eine erniedrigte forcierte Einsekundenkapazität FEV1, eine positive Antwort auf Bronchodilatatoren sowie durch positive Allergen-Pricktest-Reaktionen aus. Im Unterschied zeigen TH2-hoch Asthmatiker jedoch ein höheres Maß an bronchialer Hyperreagibilität, höhere Serum-IgE-Konzentrationen und sowohl in der broncho-alveolären Lavage als auch im Blut eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen (164, 165). Auch eine erhöhte Anzahl an intra-epithelialen Mastzellen ließ sich bei TH2-hoch-Asthmatikern finden (59). Weiterhin zeigte sich eine Induktion von *MUC*5AC und *MUC*2 sowie eine Unterdrückung von *MUC*5B im TH2-Endotyp. Am deutlichsten zeigt sich jedoch die Alteration in der Expression der Mucin-Gene in der Ratio *MUC*5AC zu *MUC*5B.

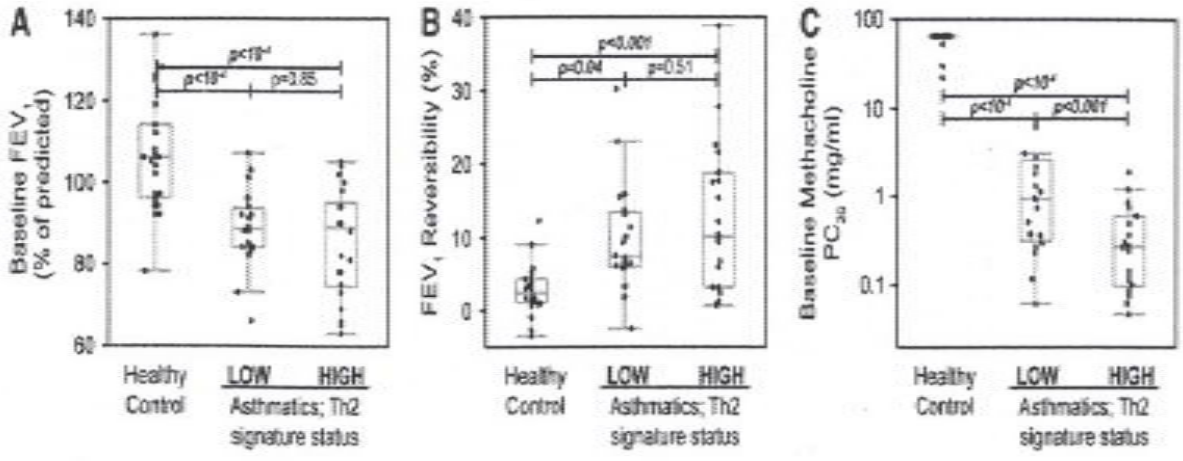


Abb. 15: Klinische Parameter des Asthma finden sich in TH2-hoch und TH2-niedrig Phänotypen. A: FEV1, B: Verbesserung des FEV1 nach 360µg Albuterol, C: Provokative Methacholin-Konzentration, um eine 20%-ige Verringerung des FEV1 zu bewirken (PC20), ein Indikator für Atemwegs-Hyperreagibilität. Aus Woodruff et al. (165)

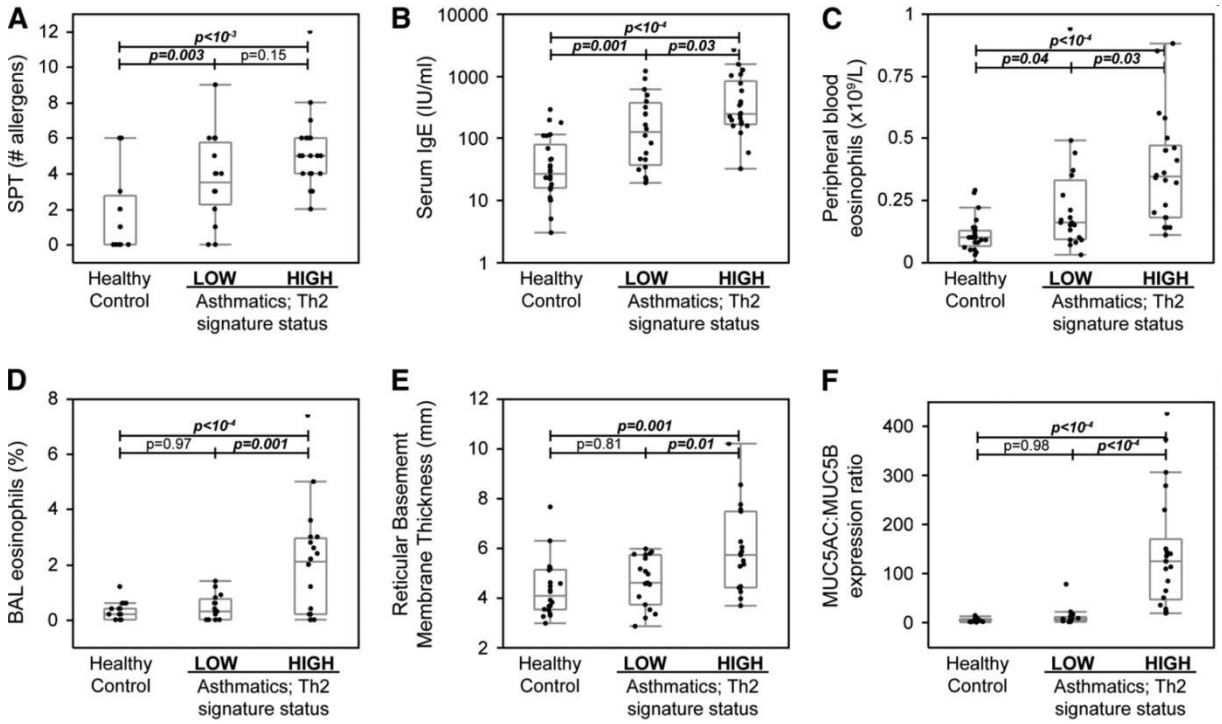


Abb. 16: Marker der Allergie, der eosinophilen Inflammation sind erhöht im TH2-hoch Asthma. A: Skin Prick Test, B: IgE, C: Eosinophile im peripheren Blut, D: Qualitativer Anteil von Eosinophilen im de BAL, E: Subendotheliale Fibrose, Messung der Dicke der retikulären Basalmembran, F: Ratio MUC5AC zu MUC5B. Aus Woodruff et al. (165)

Ebenso konnte eine erhöhte Expression der 15-Lipooxygenase (*ALOX*15) in Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden.

Diese Daten sowie die Tatsache, dass sich TH2-hoch und TH2-niedrig Asthmatiker auch im zellbiologischen Profil ihrer Entzündungsreaktion unterscheiden, legt nahe, dass der TH2-hoch-gesteuerte molekulare Mechanismus dem zellulären Phänotyp des eosinophilen Asthma zugrunde liegt. Diese Annahme wird auch durch folgende Beobachtung gestützt: um zu prüfen, wie TH2-hoch und TH2-niedrig-Asthmatiker auf eine Behandlung mit inhalativen Cortikosteroiden reagieren, wurden Daten bezüglich der randomisierten, Placebo-kontrollierten Fluticason-Behandlung aus der oben genannten Studie (164, 165) unter Berücksichtigung von TH2-Endotyp und non-TH2-Endotyp

reanalysiert. Es zeigte sich eindeutig, dass die TH2-hoch Gruppe von der Steroidgabe profitierte, während die TH2-niedrig-Gruppe auf die Behandlung resistent reagierte, und keine Verbesserung der Lungenfunktion aufwies. Die vorausgegangene Stratifizierung in TH2-hoch und TH2-niedrig war anhand der zuvor analysierten 3-Gen-Signatur aus Zellen des bronchialen Epithels (epitheliale Brushings) und der sich daran anschließenden hierarchischen Custeranalyse erfolgt (14).

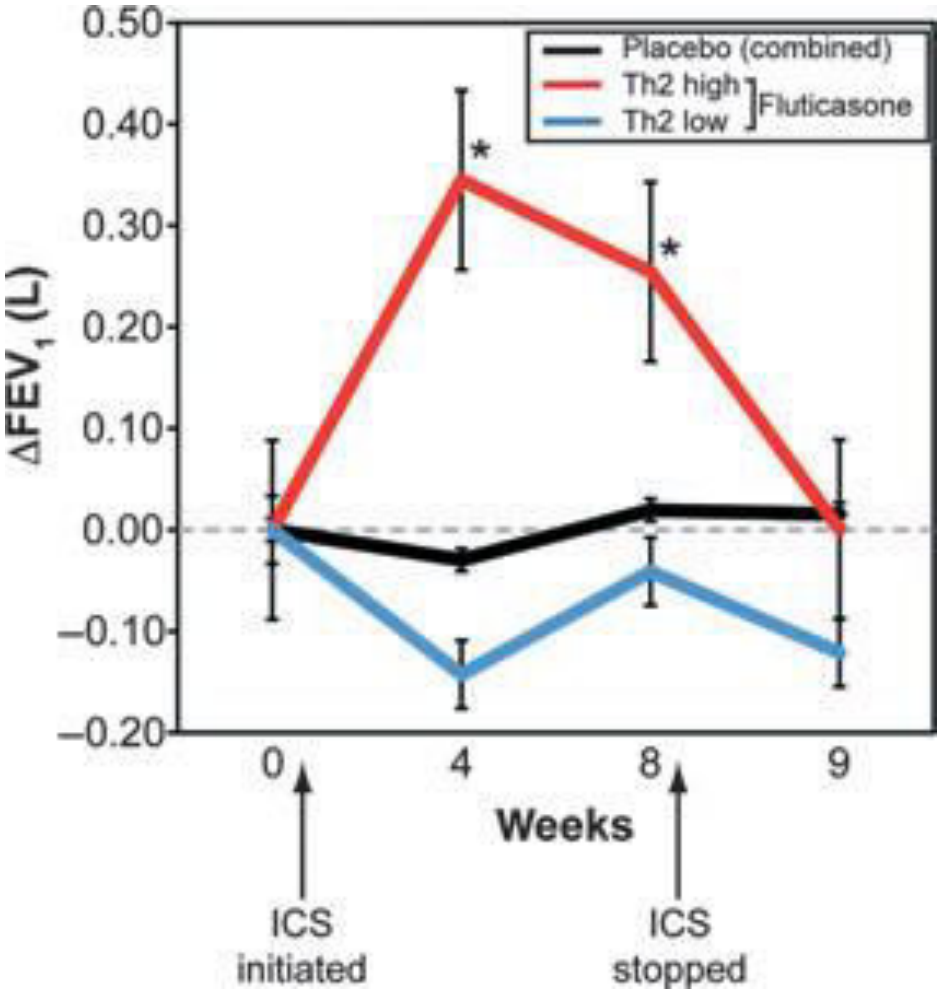


Abb. 17: Ansprechen von TH2-hoch Asthma auf inhalative Cortikosteroide in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie. Aus Bhakta et al. (14)

Molekulare Phänotypisierung hat also bedeutsame therapeutische Implikationen. Während der TH2-Endotyp bzw. der eosinophile Subtyp der Asthmatiker die Responder in der Steroidbehandlung darstellt, scheint das TH2-niedrig-Asthma, welches vermutlich dem neutrophilen Phänotyp entspricht, weniger gut verstanden zu sein hinsichtlich der molekularen Pathogenese. Auch deshalb bieten sich hier weniger potentielle therapeutische Targets an. Da hier nicht der TH2-Signalweg beschritten wird, versagt hier zwangsläufig neben der fehlenden Steroidempfindlichkeit selbstverständlich auch die Beeinflussung der Targets des einer TH2-Antwort zugrundeliegenden Signalweges.

Auf der anderen Seite jedoch kann der TH2-Endotyp herangezogen werden, um entsprechende selektive Therapien zu stratifizieren. Zum einen können Steroidresponder vorhergesagt werden, zum anderen könnten Target-basierte Therapien, die in der Gesamtpopulation gescheitert sind, jetzt nach Stratifizierung signifikant wirksam sein. Vor diesem Hintergrund wurde in einer Studie von Corren et al. (28) ein randomisierter, Placebo-kontrollierter Ansatz mit einem monoklonalen Antikörper gegen Interleukin-13, also einem klassischen TH-2-Zytokin, welches im TH2-Endotyp pathogenetisch bedeutsam ist, verfolgt. Es wurden 219 Asthmatiker entsprechend dem TH2-hoch- oder –niedrig-Phänotyp anhand des Gesamt-IgE, der Bluteosinophilie und der Serum-Periostin-Konzentration stratifiziert. Der primäre Endpunkt war das FEV1. Es erfolgte eine mehrwöchige Behandlung mit monoklonalen Anti-IL-13-Antikörpern (Lebrikizumab), mit dem Ergebnis, dass es nur in der TH2-hoch-Gruppe, also dem TH2-Endotypen definiert durch die Surrogatmarker Periostin, Gesamt-IgE und Blut-Eosinophile, zu signifikanten Verbesserungen bezüglich des primären Endpunkts kam.

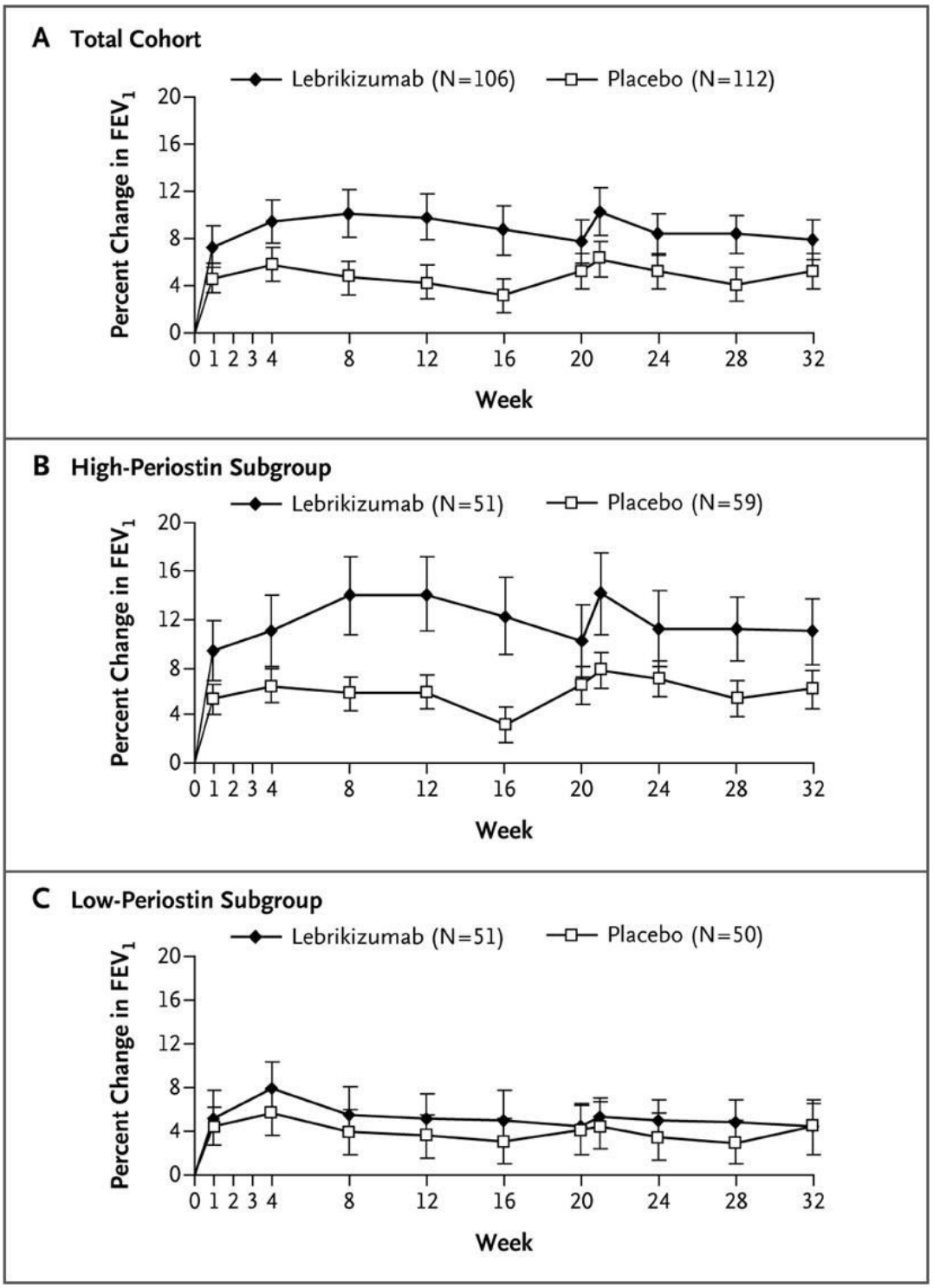


Abb. 18: Relative Änderung der FEV1 unter Behandlung mit anti-IL-13-Antikörpern (Lebrikizumab) in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Intention-to-Treat-Studie über 32 Wochen. A:Besserung der FEV1 unter Lebrikizumab in allen Kohorten. B: Signifikante, deutliche Besserung der FEV1 unter anti IL-13 Therapie in der Gruppe mit hohen Periostin-Leveln, C: nur mäßig Änderung der FEV1 in der Subgruppe mit niedrigen Periostin-Leveln. Aus Corren et al. (28)

Ein Target-basierter Ansatz, der in unselektierten Kollektiven als statistisch nicht signifikant getestet wurde, erweist sich dann als signifikant wirksam, wenn zuvor entsprechend der dahinterstehenden Rationalen, nämlich des Endotypen, also entsprechend des Wirksamkeitsansatzes stratifiziert wird.

Auf dem Boden der Erkenntnis, dass sich anhand der An- oder Abwesenheit einer Drei-Gen-Signatur [*CLCA*1, Periostin (*POSTN*), PAI2, (*SERPIN*B2)] eine molekulare Phänotypisierung in einen TH2-hoch- und einen TH2-niedrig-Phänptyp bzw. Endotypisierung in einen TH2-Endotypen und einen non-TH2-Endotypen vornehmen lässt, konnten weitere Studien (25) ein ganzes Panel von Genen bzw. eine Signatur identifizieren, die einen TH2-hoch-Typ repräsentiert und von einem TH2-niedrig-Typen signifikant unterscheidet. Im Unterschied wurde hier die Ausgangs-mRNA aus nicht aus bronchialen Brushings sondern anhand bronchialer Biopsien von Asthmatikern und gesunden Kontrollen gewonnen. Genexpressionsanalysen mittels Whole-Genome-Microarray und anschließender Bestätigung durch rtPCR-Analysen der endobronchialen Biopsien zeigten, dass eine TH2-Inflammation über ein Kontinuum von Genen exprimiert wird mit einer Korrelation zu lokalen und systemischen Markern bezüglich Allergie und eosinophiler Inflammation.

Auf der Basis der drei bekannten hochregulierten TH2-Gene, also den 3-Gen-definierten TH2-Status als vorgegebenes Stratifizierungs- Kriterium vorausgesetzt, wurden die mittels Microarray identifizierten unterschiedlich exprimierten Gene statistischen Analysen (two-sample t-Test) unterzogen, um eine *DE probe list,* eine Liste der differentiell exprimierten Gene (DE = differentially expressed) zu generieren. Eine tatsächliche Heraufregulation der fraglichen Gene konnte zuvor durch quantitative real-time-PCR verifiziert werden. Es ergibt sich nun also ein ganzes Panel oder Muster von heraufregulierten TH2-Genen, welche als TH2-Signatur zusammengefasst werden können, und welche alle in Zusammenhang mit Inflammation, Allergie, TH2-Zytokinen und Eosinophilie stehen. Neben dem bereits beschriebenen

*CLCA*1 finden sich hier auch Mucine wie *MUC*5B (Herabregulation) oder *MUC5AC* (Heraufregulation) sowie Chemokine (C-C motif) ligand 26 (*CCL26*) sowie diverse weitere die TH2-Signalwege betreffende und assoziierte Gene (25).

CCL26 war hier das am stärksten unterschiedlich exprimierte Gen zur Unterscheidung zwischen TH2-hoch und TH2-niedrig Asthma.

Es zeigte sich darüber hinaus eine deutliche Korrelation zwischen der *CCL26* Expression in den Biopsaten und dem mittels qPCR quantifizierten TH2-Zytokin IL-5, nicht jedoch mit IL-4; und eine negative Korrelation mit dem TH1-Zytokin IL-12A. Weiterhin besteht eine positive Korrelation zwischen *CCL26* und Serum-IgE, peripheren Blut-Eosinophilen, sowie ein Trend zur Assoziation mit dem Eosinophilen–Anteil in der bronchoalveolären Lavage. Unter den differentiell exprimierten Genen der DE-Liste fanden sich weitere mit einer TH2-Inflammation assoziierte Gene, wie für NO-Synthase 2A, (*NOS2A*), Histaminrezeptor H1, GPR44, IgE und Lipoxygenase 15 (*ALOX15*) codierende Gene. Die differentielle Expression der DE-Gene ist konsistent mit der phänotypischen Beschreibung von TH2-hoch und TH2-niedrig-Asthma (25).

Nicht mehr ein einzelnes Gen bzw. das Panel aus drei Genen bestimmt jetzt den TH2-hoch-Typ, sondern ein ganzes Kontinuum über nunmehr 93 differentiell exprimierte Gene; ein Genset definiert den TH2-Endotypen, nicht mehr die Expression eines einzelnen Gens korreliert mit dem Level verschiedener Inflammationsmarker oder Zytokine, sondern eine ganze Signatur (25).

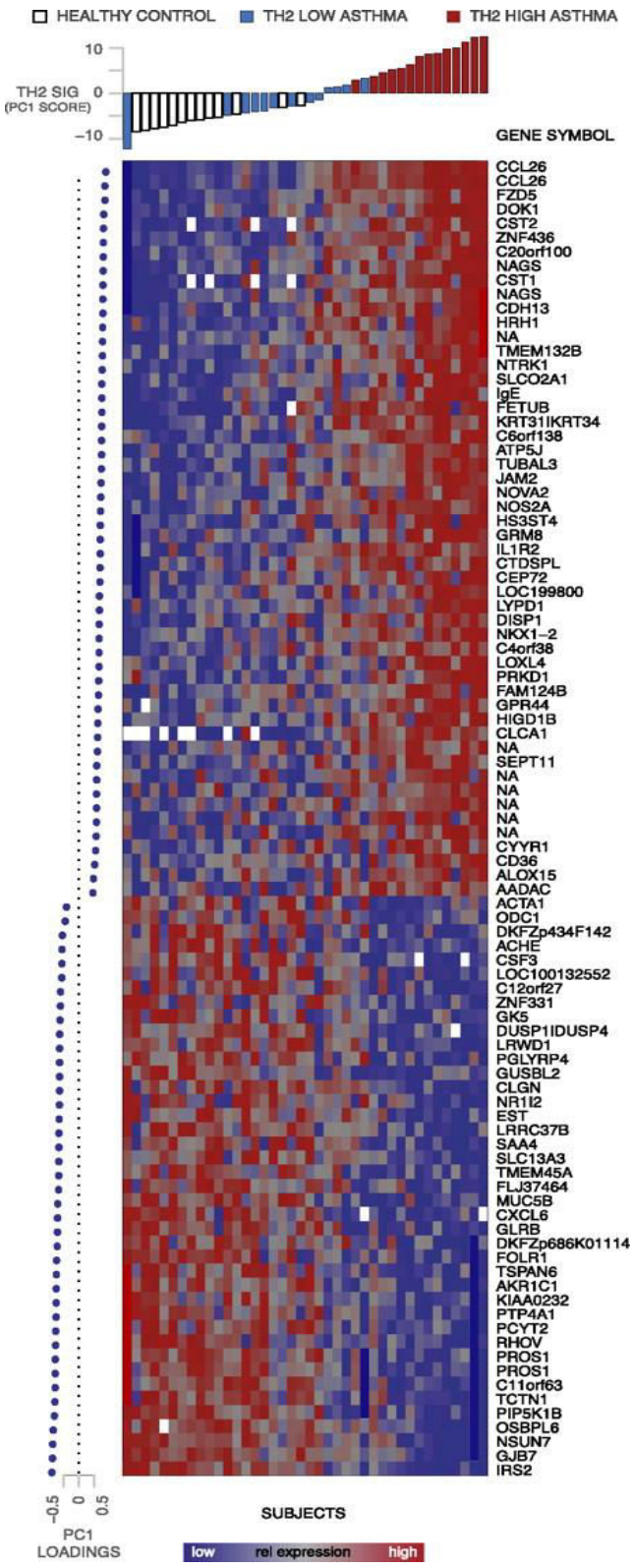


Abb. 19: TH2-Signatur quantifiziert ein Kontinuum von TH2-assoziierter Genexpression. Darstellung als Heatmap aus whole-genome Micro-Array-Analysen und RT-PCR aus bronchialen Biopsaten. Eine Spalte repräsentiert ein Individuum, eine Zeile das differentiell exprimierte Gen. Aus Choy et al. (25)

Es besteht eine deutliche Korrelation der Gesamt-Signatur bzw. des gesamten TH2-hoch-Kontinuums sowohl mit klassischen TH2-Zytokinen oder Inflammationsparametern als auch mit anhand der Drei-Gen-Signatur vordefinierten molekularen TH2-hoch oder TH2-niedrig Phänotypen/Endotypen.

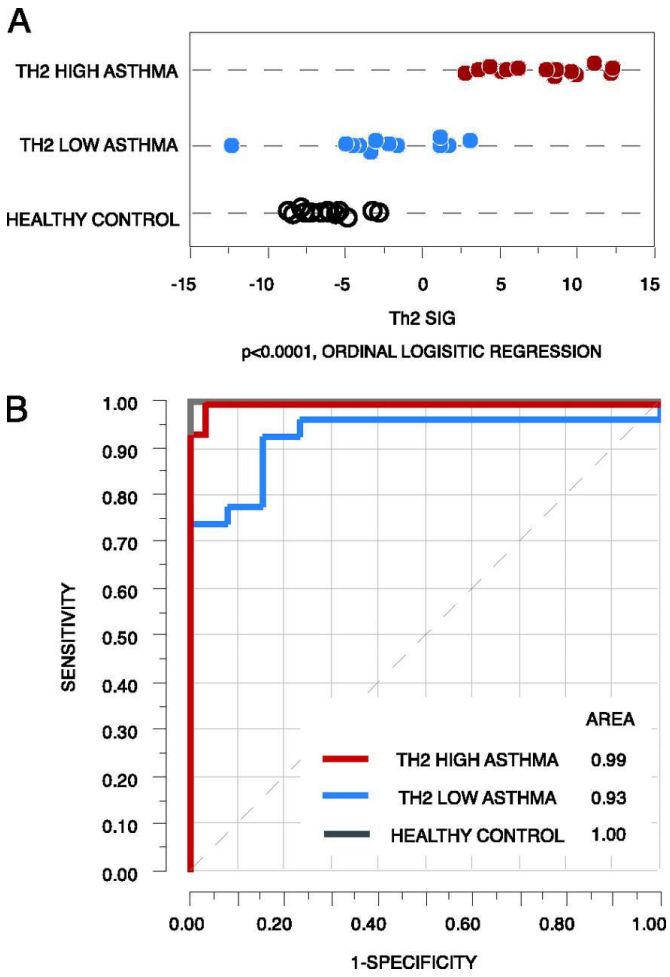


Abb. 20: A) Logistische Regression der TH2-Phänotypen auf dem Boden der Bronchialepithel-Biopsie TH2-Signatur. B) Reciever Operating Characteristic (ROC) Kurve des Regressionsmodels der TH2-Signatur. Aus Choy et al. (25)

Die folgenden Abbildungen stellen die Korrelation der TH2-Gen-Signatur mit verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren dar, wobei sich mit Zytokinen, die in den TH2-Signalweg involviert sind, eine positive Korrelation ergibt, wohingegen bei Zytokinen, die den TH1-Signalweg betreffen, sich eine negative Korrelation abzeichnet.

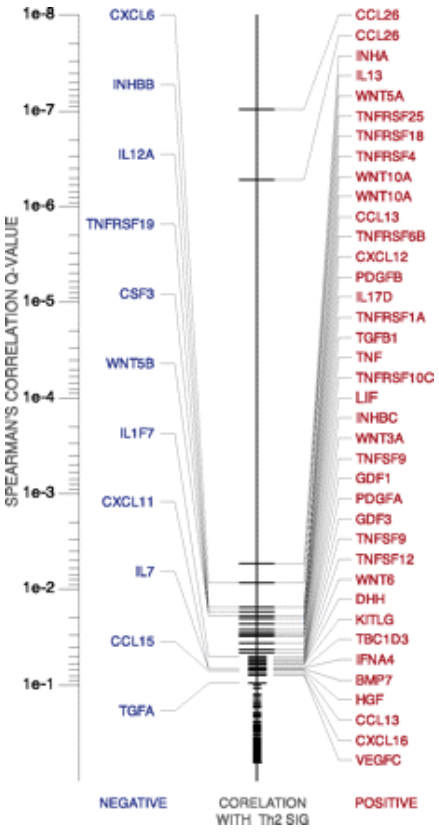


Abb. 21: TH2-hoch Signatur beim Asthma: Korrelation einer TH2-Signatur mit Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Rot: positive Korrelation, Blau: negative Korrelation bei TH2-hoch-Signatur. Aus Choy et al. (25)

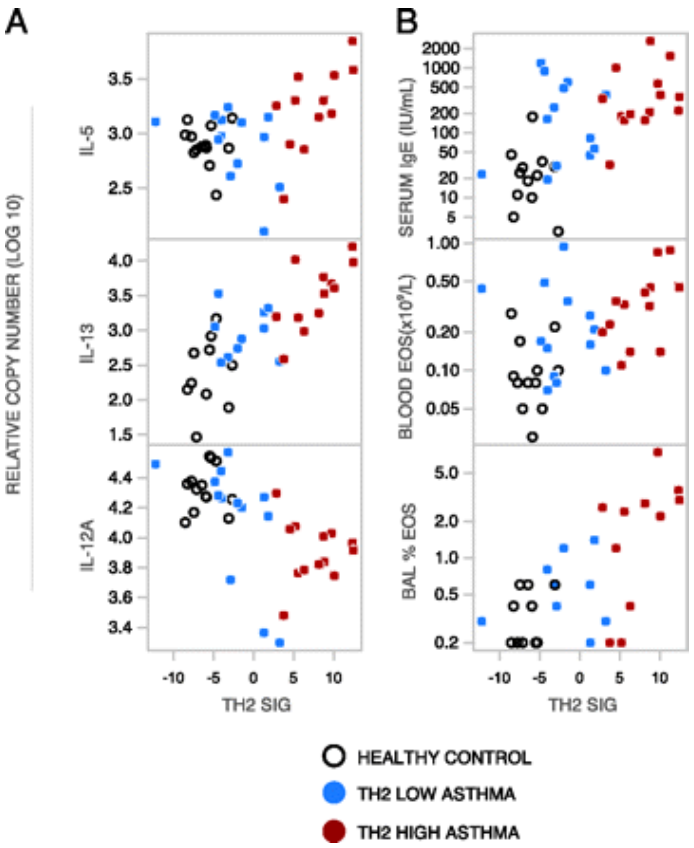


Abb. 22: Charakteristika der TH2-Signatur, Korrelation (Spearman) mit Zytokinen, und weiteren Inflammationsparametern in bronchialen Biopsien. A: Korrelation der TH2-Signaturen mit Interleukinen (Copys PCR), B: Korrelation mit Eosinophilen in Blut und BAL sowie Serum-IgE. Aus Choy et al. (25)

Durch Genexpressions-Profiling anhand bronchialer Biopsien und direkten Vergleich von TH2-Subtypen konnte also nachgewiesen werden, dass hoch differentiell exprimierte Asthma-Gene Teil eines koordinierten Musters, eines Kontinuums spezieller Gene sind, deren biologische Funktion in Zusammenhang mit TH2-Inflammation, Atopie und Allergie steht. Zum Nachweis intrinsischer Heterogenität konnte anhand des 3-Gen-TH2-Signatur-Status ein ganzes TH2-hoch-Panel identifiziert werden.

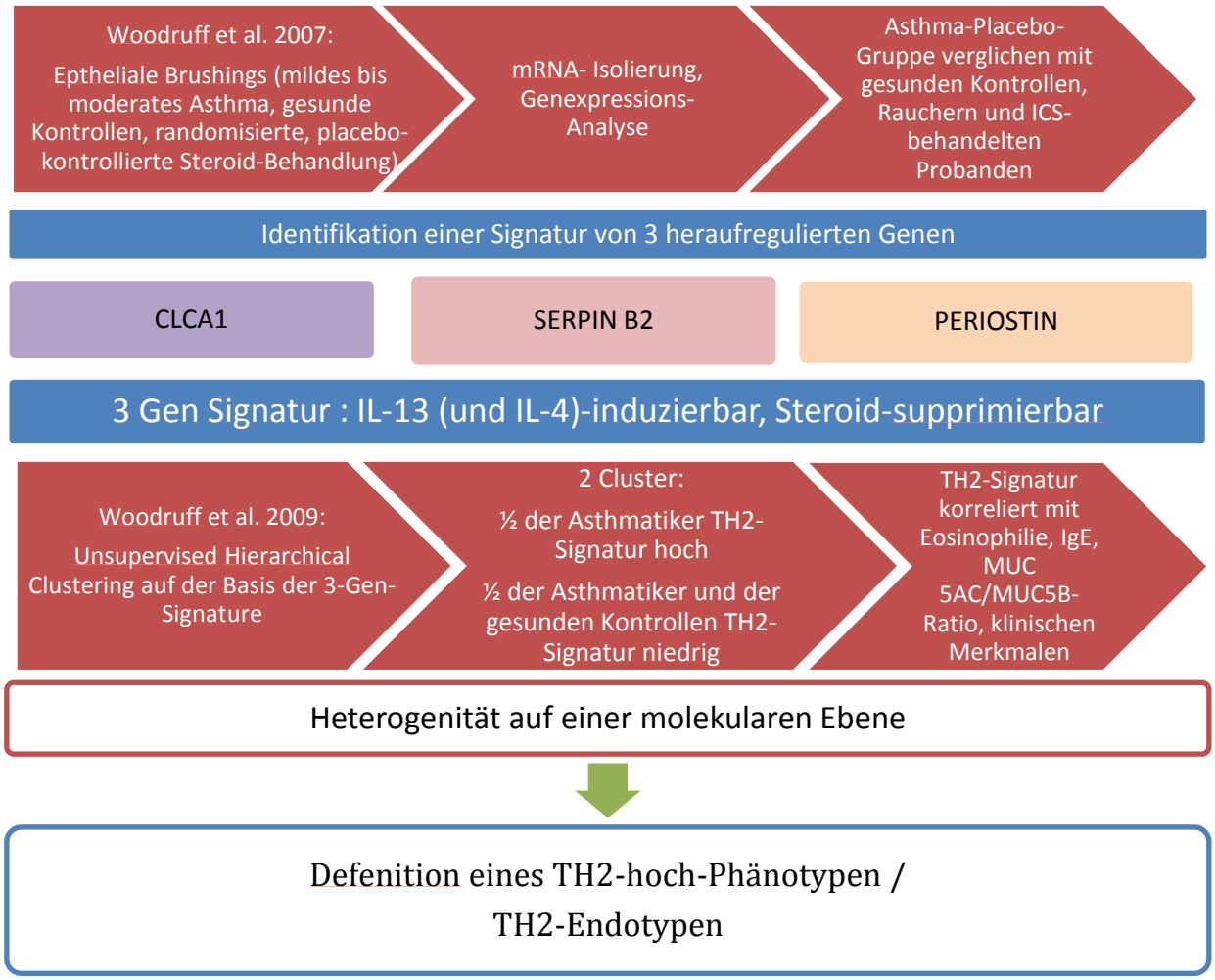


Abb. 23: Prozess der Identifizierung des TH2-Endotyps

Molekulares Phänotypisieren durch Anwendung von Gen-Expressions-Microarrays und statistischen Anwendungen wie Hierarchischem Clustering oder SPCA kann also Einsichten in die phänotypische Heterogenität und zugrundeliegende Signalwege liefern. Gegenüber dem Phänotypisieren anhand von Sputum-Zellen oder zytologischer oder klinischer Parameter ergibt sich der Vorteil, dass zugrundeliegende molekulare Mechanismen, die die Entzündung steuern, nachvollzogen werden können. Es können Gene identifiziert werden, welche Schlüsselpunkte in der Pathogenese darstellen oder möglicherweise den Ort potentieller Mutationen repräsentieren. Hierdurch können sich auch neue Ansatzpunkte zur Target-basierten Therapie ergeben. Patienten, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, von einer bestimmten molekularen, Target-

basierten Therapie zu profitieren - da in ihnen ein bestimmter Signalweg in der Pathogenese beschritten wird - müssen identifiziert und selektiert werden. Hierzu können die sezernierten Proteine bestimmter über- oder ggf. auch unterexprimierter Gene zur Identifikation eines bestimmten molekularen Endotyps als Biomarker herangezogen werden.

Plasma-Proteine haben den offenkundigen Vorteil, dass ihre Gewinnung im Gegensatz zu bronchoskopischen Proben wesentlich einfacher, kostengünstiger und weniger invasiv ist. Auch die Analytik kann – zumal wenn sie automatisiert erfolgt – schneller und einfacher sein als beispielsweise eine zytologische Untersuchung.

Welche Plasmaproteine im Einzelnen geeignet sind, eine signifikante Unterscheidung zwischen TH2-hoch und TH2-niedrig-Phänotypen bzw. TH2-Endotyp vorzunehmen, muss nach einer theoretischen Prüfung ihrer grundsätzlichen Eignung anhand von Proben mit vorbekanntem TH2-Status, also bekannter TH2-Signatur ermittelt werden.

Zunächst einmal bieten sich als potentielle Biomarker all jene Proteine an, welche die Genprodukte der jeweils heraufregulierten Gene im TH2-Endotyp darstellen.

Dort wäre zuerst zu nennen das in den oben zitierten Studien (164,165) initial gefundene Dreierpanel

- CLCA1
- Periostin
- PAI2

Weiterhin fanden Woodruff, Haldar und Baines (58, 8) eine Heraufregulierung der Gene codierend für

- Carboxypeptidase A3
- Tryptase alpha/beta1
- Tryptase beta2

Choy et al. (25) beschreiben eine Heraufregulierung der Gene codierend für

- CCL26 (MIP4)
- MUC5AC

und eine Herabregulierung von

- MUC5B,

woraus eine erhöhte Ratio von MUC5AC zu MUC 5B resultiert.

Darüber hinaus wiesen Dougherty et al. (31) in Individuen mit einer TH2-hoch-Signatur neben einer erhöhten intraepithelialen Anzahl von Mastzellen (mit einem untypischen Protease-Phänotyp) auch eine erhöhte Expression des

- Stammzellfaktors (SCF)

(wiederum ein wichtiger IL-13-induzierbarer Wachstumsfaktor für Mastzellen) nach.

Im Rahmen der statistischen Evaluation der TH2-Signatur fanden Choy et al. (25) unter anderem eine Heraufregulierung der Gene codierend für

- NO-Synthase A2 (*NOS*A2)
- des Histaminrezeptors H1
- das Chemoattractand-Rezeptor homologe Molekül (exprimiert auf TH2-Zellen) GPR44
- sowie die Arachidonate 15-Lipoxygenase (*ALOX*15).

Choy und Woodruff (165) beschreiben ebenfalls eine Heraufregulierung der

- Lipoxygenase 15 *(ALOX 15),*

einem wichtigen Enzym im Arachidonsäuremetabolismus, welches an der Synthese von Leukotrienen beteiligt ist.

Darüber hinaus wurden bei Verrils (154) Biomarker beschrieben, die differenzieren können zwischen Asthma und COPD wie

- Alpha2-Macroglobulin
- Haptoglobin
- Ceruloplasmin
- Hämopexin

oder keine Plasma-Proteine darstellen, wie

- Die Fraktion des exhalierten Stickstoffmonoxyds, FeNO (12)
- Die intraepitheliale Mastzell-Anzahl. (31)

oder eine TH1-Antwort/Differenzierung initiieren und eine TH2-Antwort zu supprimieren vermögen und ihrerseits selber durch TH2-Zytokine supprimiert werden können.

- Osteopontin (87, 166, 130)

Im Folgenden erfolgt eine kurze Darstellung der einzelnen potentiell als Biomarker geeigneten Plasmaproteine, soweit hierzu gesichertes Wissen vorliegt. Viele Einzelheiten bezüglich der Regulation und Funktion sowie bezüglich des Stellenwerts in verschiedenen Signalwegen sind Gegenstand aktueller Forschung und Diskussion.

1.8 Potentielle Biomarker

1.8.1 CLCA1

Calcium-activated chloride channel regulator 1 ist ein im Menschen durch das *CLCA*1-Gen codierte Protein. CLCA1 ist ein Mitglied der Familie der Calcium-abhängigen Chlorid-Kanal-Proteine. Alle Mitglieder dieser Gen-Familie werden in derselben Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p31-p22) erfasst und zeigen ein hohes Maß an Homologie in Größe, Sequenz und vorhergesagter Struktur, unterscheiden sich jedoch wesentlich in ihrer Gewebeverteilung (55).

Alle CLCA-Proteine werden als ungefähr 125 kDa große Precursor-Transmembran-Glycoproteine synthetisiert und posttranslational autokatalytisch in 90 und 35 kDa Untereinheiten gespalten (120).

Im Atemwegsepithel scheint CLCA1 eine Rolle bei der Sezernierung von Chlorid-Ionen in das Lumen zu spielen und trägt hierdurch zur Zusammensetzung des sezernierten Schleims im Hinblick auf seinen Salz- und Wassergehalt bei (55, 95).

Die CLCA-Proteine sind sezernierte Proteine, welche zum einen in die Regulation des transmembranösen Chloridtransports via Calcium-sensitiver Chloridkanäle involviert sind, zum anderen jedoch auch steuernde Eigenschaften die *MUC*-Gen-Expression betreffend haben und hierdurch die Produktion von Mucus in respiratorischen oder intestinalen Geweben beeinflussen können (65).

Die CLCA1-Proteine werden als Vorläuferproteine exprimiert und enthalten eine übereinstimmende proteolytische Spaltstelle, welche durch eine im CLCA1-Molekül selbst enthaltene N-terminale Zink-Metalloprotease erkannt wird (122).

Die Aktivierung von CLCA1 erfordert eine Selbst-Prozessierung in zwei Zelloberflächen–assoziierte Untereinheiten. CLCA1-Mutationen, welche nicht zur Selbstprozessierung befähigt sind oder die Selbstprozessierung unterbinden,

verhindern eine CLCA1 vermittelte Aktivierung Calcium-abhängiger Chloridkanäle. Ein Chloridtransport über Ca^{2+} abhängige Cl^--Kanäle erfordert die Freilegung des N-terminalen CLCA1-Fragments, welches nun unabhängig CA^{2+} abhängige Cl^--Kanäle öffnen kann. CLCA1 ist kein Transmembranprotein, kann selber also kein Chloridkanal sein, sondern ist ein über Protein-Protein-Interaktion membran-assoziiertes Protein. Neben dem Mechanismus der Selbstprozessierung ist CLCA1 auch befähigt, Cl^--Kanäle spezifisch im Respiratorischen Epithel zu regulieren (49).

Wie eingangs erwähnt, stellt das CLCA1-Protein nicht nur einen Regulator in Bezug auf die Chloridkanal-Aktivität dar und ist hierdurch beteiligt an der Regulation der Mucus-Sekretion intestinaler und respiratorischer Epithelien, sondern ist darüber hinaus auch in Vorgänge der Zell-Zell-Adhäsion, Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle und Blutdruck eingebunden (94, 95).

Die Expression von *CLCA*1 ist besonders stark in epithelialen Becherzellen bei Asthmatikern induziert, während dies in der gesunden Lunge bzw. in gesunden Atemwegen nicht der Fall ist. In vitro Transfektionstudien konnten zeigen, dass die *CLCA*-Gene eine wesentliche Rolle in der Mucus Produktion spielen und direkten Einfluss hierauf nehmen (151, 110, 175, 72). IL-9 und IL-13 sind in der Lage, Becherzellmetaplasie zu induzieren, welche wiederum assoziiert ist mit einer Expression des Calcium-abhängigen Chloridkanal-Proteins1 (33). IL-9 und IL-13 steigern den UTP-abhängigen Chloridionen-Transport via *CLCA*1-Expression und die hieraus folgende Aktivierung von CA^{2+} abhängigen Cl^--Kanälen in humanen Bronchialepithelzellen (33). Weiterhin wurde gezeigt, dass die *CLCA*1-Expression konzentrationsabhängig durch IL -9 induziert werden kann, und darüber hinaus dass die *CLCA*1-Expression in Zellkultur spezifisch die Produktion löslicher, gelformender Mucine induzieren kann (174). Eine Heraufregulation in vitro von *CLCA*1 in Interleukin-9 positiven, Mucus-produzierenden Epithelzellen von Asthmatikern im Vergleich zu gesunden

Kontrollen zeigt, dass die Regulation des CA^{2+}-Cl^--Kanals über *CLCA*1 zum Teil mitverantwortlich ist für die Überproduktion von Mucus in Asthmatikern (151).

1.8.2 Plasminogen Aktivator Inhibitor-2 (PAI2) oder SerpinB2

PAI2 ist ursprünglich bekannt als ein in Vorgänge der Hämostase eingreifender Faktor, welcher befähigt ist, sowohl den tissue-type-Plasminogen-Aktivator (tPA) als auch den urokinase-type-Plasminogen-Activator (uPA) zu inaktivieren. PAI2 ist in den meisten Zellen präsent, insbesondere in Monozyten und Makrophagen. PAI2 existiert in zwei Formen, nämlich in einer 60 kDa glycosylierten, sezernierten Form, welche unter anderem die bekannte Rolle in der Hämostase spielt, als auch in einer 47 kDa intrazellulären, nicht glycosylierten Form (133).

Detektierbare Mengen von PAI2 im Blut finden sich physiologischerweise vor allem während der Schwangerschaft, da es unter anderem durch die Plazenta in quantitativ messbarer Konzentration gebildet wird. Vor diesem Hintergrund erklärt sich möglicherweise eine Mitursache für ein erhöhtes Thromboserisiko während der Schwangerschaft. Der größte Teil jedoch – nämlich die 47 kDA-Form - wird nicht sezerniert und scheint die Funktion eines intrazellulären Signalpeptids zu haben. Ob die Hauptbedeutung von PAI2 nun in der Inaktivierung der Protease Urokinase zu sehen ist oder in den intrazellulären Funktionen bleibt vorerst unklar (133).

Einige der intrazellulären Effekte konnten in letzter Zeit zumindest teilweise gezeigt werden: so ist PAI2 offensichtlich in der Lage, die Genexpression zu alterieren, die Rate der Zellproliferation und die Zelldifferenzierung zu beeinflussen und Apoptose zu inhibieren (101).

Yu et al. (168) beschreiben PAI2 als einen Mediator der Monozyten-Adhäsion, -Proliferation und -Differenzierung. Diverse weitere Effekte von intrazellulärem

PAI2 wurden beschrieben, hier scheint vor allem die Rolle in der Regulation der adaptiven Immunität bedeutsam zu sein.

Swartz et al. (144) beschreiben PAI2 als ein insbesondere in Eosinophilen quantitativ in bedeutsamen Mengen synthetisiertes Protein. Sowohl die 47 kDa intrazelluläre Form als auch die 60 kDa extrazelluläre Form wurde in hohen Konzentrationen in humanen Eosinophilen nachgewiesen. Mit einem Mittel von 182 ng/10^6 Zellen (eosinophilen Granulozyten) war dies die höchste Konzentration in allen evaluierten Leukozyten Subtypen. Neben den hämostaseologischen Eigenschaften konnte eine im weitesten Sinne immunologische Bedeutsamkeit nachgewiesen werden. Immunhistochemisch ließ sich PAI2 sowohl in eosionophilen-spezifischen Granula als auch in extrazellulären Deposits in und um ein Eosinophilen reiches Granulom-Gewebe-Infiltrat nachweisen, welches Parasiteneier (Schistosoma mansoni) in den Lebern von Wildtypmäusen umkapselte.

Swartz et al. (144) schlagen für aus eosinophilen Granulozyten stammendes PAI2 eine Funktion im Bereich der Inflammation und des Remodelings vor – sowohl auf dem Gebiet der Parasiteninfektionen wie auch im Bereich der allergischen Atemwegserkrankungen. Darüber hinaus mag PAI2 eine Bedeutung bezüglich respiratorischer Virusinfekte sowie in der Tumorimmunologie und Metastasenentwicklung haben (144).

Es scheint Evidenz für die Tatsache zu geben, dass *Serpin*B2(-/-)-Mäuse eher bereit sind, eine TH1-Entzündungsantwort generieren, was den Schluss nahelegt, dass SerpinB2/PAI2 durchaus eine Funktion in der Differenzierung von T-Zellen einnimmt (133).

1.8.3 Periostin

Periostin, ein ursprünglich aus Osteoblasten isoliertes und als Osteoblasten-spezifischer Faktor 2 beschriebenes Protein, ist ein durch das *POSTN*-Gen codiertes, Disulfid-Brücken tragendes, 90 kDa großes matrizelluläres Protein.

Periostin ist durch Interleukin 4 und Interleukin 13 in Atemwegs-Epithelzellen induzierbar (170, 146) und wird von Fibroblasten in die extrazelluläre Matrix sezerniert (147, 71). Außer der durch IL-4 und IL-13 vermittelten Induzierbarkeit in Epithelzellen scheint auch eine Induzierbarkeit durch das antiinflammatorische Zytokin TGF-beta in Fibroblasten gegeben zu sein (146).

Es existieren vier verschiedene, in der Länge der C-terminalen Domäne differierende Isoformen, die sich vermutlich auf alternatives Splicen zurückführen lassen (71).

Periostin ist ein zur Fascilin-Familie gehörendes, matricelluläres Protein bestehend aus Cystein-reichen Domänen am N-terminalen Ende und vier repetitiven Fascillin-1-Domänen (147). Insofern kann Periostin als ein Adhäsionsmolekül fungieren. Es interagiert mit verschiedenen Integrin-Molekülen auf Zelloberflächen wie alpha-V/beta1, alpha-V/beta3 und alpha-V/beta5 und vermittelt Gewebe-Differenzierung, Wachstum und Remodeling betreffende Signale (99).

Als Ligand für die genannten Integrine unterstützt es Zelladhäsion und Migration (51). Periostin scheint eine modulierende Funktion in der Knochenentwicklung, der Zahnentwicklung sowie der Entwicklung von Herzklappen zu haben, ebenso wie in der Entwicklung mesenchymaler Gewebe (126, 140). Periostin ist in der Lage, die Proliferation von Kardiomyozyten zu induzieren und hat eine modulierende Funktion in Umbauprozessen nach Myokardinfarkt bzw. während aktivem Remodelings oder akutem Stress (91, 80, 90). Ebenfalls tritt es als Mediator in Abläufen der physiologischen epidermalen Wundheilung auf (91, 137). Periostin scheint involviert zu sein in

die Entwicklung verschiedener Tumore via des Integrin/PI3K/Akt Signalwegs (129).

Darüber hinaus ist es ein durch IL-4 und IL-13 hoch induzierbares Produkt in Lungenfibroblasten. Es vermag durch chemotaktische Prozesse Eosinophile in entzündetes Gewebe zu rekrutieren und spielt darüber hinaus auch eine wesentliche Rolle in der Fibroseentwicklung des Asthma bronchiale (64, 146), was alles in allem eine generelle Beteiligung von Periostin als Mediator in Abläufen allergischer Entzündungen möglich erscheinen lässt.

Die bislang beschriebenen Funktionen und Effekte von Periostin im allergischen Geschehen sind mehrschichtig.

So fanden Blanchard et al. (15), dass Periostin im Ösophagus von Patienten mit Eosinophiler Ösophagitis überexprimiert wird, und zwar downstream von TGF-beta und IL-13. Eine funktionelle Rolle von Periostin in der Eosinophilen Ösophagitis kann insofern angenommen werden da *Periostin*-knock-out-Mäuse einen spezifischen Defekt in der Allergen-induzierten Rekrutierung von Eosinophilen in die Lunge wie auch den Ösophagus aufweisen. Weitere Analysen lieferten den Nachweis, dass Periostin die Eosinophilen-Adhäsion an Fibronectin um ein 5,8 faches steigern kann. Hieraus lässt sich eine besondere Fähigkeit für Periostin ableiten - nämlich die direkte Regulierung der Akkumulierung von eosinophilen Granulozyten in TH2-assoziierter, mucosaler Entzündung sowohl in Mäusen als auch im Menschen.

Periostin verstärkt die Entstehung von Fibrose indem es an andere Proteine der extrazellulären Matrix bindet wie beispielsweise Kollagen 1, Fibronectin und Tenascin C. Es gibt eine Beteiligung an der Genese von Kollagenfibrillen durch Aktivierung der Lysyloxidase, einem katalytischen Enzym der intra- und intermolekularen Kreuzvernetzung von Kollagen. (146, 82, 98). Ebenso gibt es Evidenz, dass Periostin als matrizelluläres Protein die Inflammation der Atemwege durch eine Steigerung der Chemokinproduktion in Fibroblasten, wie

auch durch Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten mit beeinflusst. Darüber hinaus vermag Periostin TGF-beta im Atemwegs Epithel zu aktivieren. (152, 15, 138)

Takayama et al. (146) identifizieren *POSTN* als ein IL-4 und IL-13 induzierbares Gen in bronchialen Epithelzellen und erbrachten den Nachweis, dass sowohl IL-4 als auch IL-13 die Sekretion von Periostin in Lungenfibroblasten induzieren können. Es konnte bestätigt werden, dass dieses nun selber wiederum die Fähigkeit besitzt, Fibronectin, Tenascin-C, Kollagen-V, also verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix (und auch Periostin selber) zu binden. Es erscheint somit eine mögliche oder sogar sehr wahrscheinliche Komponente der subepithelialen Fibrose im bronchialen Asthma darzustellen, in dem es andere extrazelluläre Proteine zu binden vermag.

Ein weiterer Effekt von Periostin bezieht sich auf die Mit-Regulation der Mucus-Produktion. So konnte gezeigt werden, dass *Postn*-defiziente Mäuse nach OVA-Stimulation eine deutliche Zunahme der Mucus-Produktion entwickelten. Ein Mangel an Periostin führte zu einer Zunahme der Expression von *Muc*5ac und *Gob*5, dem Maus-Homolog zum humanen *CLCA*1. Insofern könnte Periostin im Rahmen eines negativen Feedbacks gesehen werden, um ein inflammatorisches Geschehen zu kontrollieren, indem es eine überschießende Mucus-Produktion unterdrückt. Darüber hinaus scheint Periostin auch die Produktion von IFN-gamma, also eines TH1-Mediators zu erhöhen (110, 134).

In Bezug auf allergische Hauterkrankungen lässt sich ein Circulus vitiosus beschreiben: Eine durch Allergenexposition (Hausstaubmilben) initiierte TH2-Inflammation der Haut induziert die Produktion von Periostin in Fibroblasten durch IL-4 und IL-13. Via Alpha-V-Integrin (Rezeptor für Periostin) werden Keratinozyten zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine stimuliert (u.a. TSLP). Diese wiederum verstärken die TH2-Antwort. Im Gegensatz zum Geschehen im bronchialen Epithel, wo eine Periostin-Defizienz zu einer

mangelnden Unterdrückung der Mucus-Produktion, also einer Verschlechterung der klinischen Situation führte, ist am Beispiel der Keratinozyten der Epidermis Periostin in der Wirkungskette der allergisch-inflammatorischen Antwort essentiell notwendig (99).

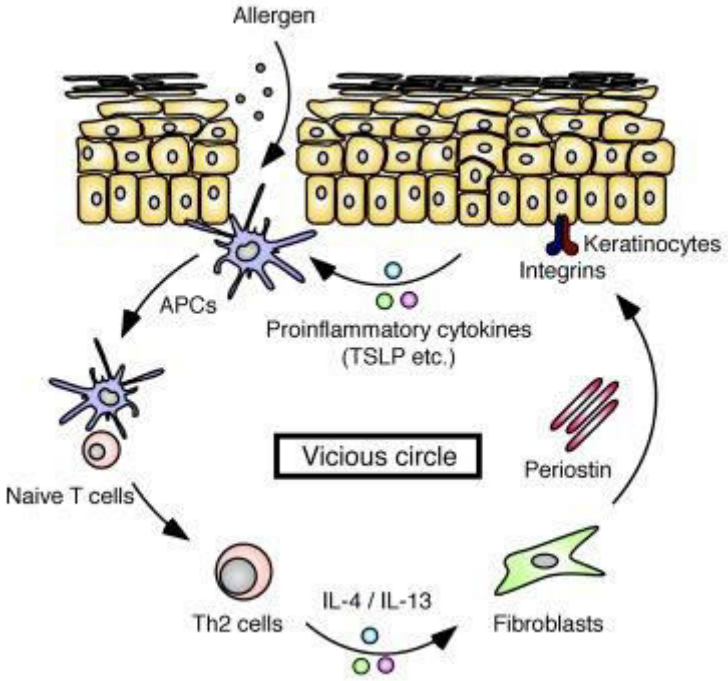


Abb. 24: Circulus vitiosus der allergischen (Haut-)inflammation unter Beteiligung von IL-4, IL-13, Periostin und TSLP. Aus Masuoka, M. (99)

Es gibt Evidenz (25, 123, 4), dass die Periostin-Level im peripheren Blut mit der oben beschriebenen TH2-hoch oder –niedrig Gen-Signatur korreliert sind. Serum-Periostin-Level zeigen sich signifikant erhöht in Patienten mit Asthma bronchiale vom eosinophilen Typ - im Gegensatz zu Asthmapatienten mit einer nur minimalen eosinophilen Atemwegs-Inflammation. Das Serum-Periostin-Level scheint hier ein guter prädiktiver Parameter für das Ausmaß der Eosinophilie in den Atemwegen zu sein.

Die Bedeutung von Periostin als Biomarker für einen TH2-Endotyp wird durch Folgendes verdeutlicht: durch Blockade von IL-13 mittels eines monoklonalen

Anti-IL-13-Antikörpers (Lebrikizumab), also durch Blockade eines typischen TH2-Signalwegs, kann eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion in einer Subgruppe von Asthmapatienten erreicht werden. In der bereits zitierten Studie von Corren et al. (28) wurden Patienten anhand ihrer peripheren Periostin-Werte als Surrogatmarker für einen TH2-Endotyp stratifiziert und einer Therapie mit anti-IL-13-Antikörpern unterzogen. Patienten mit hohen Periostin-Blutspiegeln, also Patienten des TH2-Endotyps, profitierten von der Therapie mit anti-IL-13-Antikörpern signifikant besser als Patienten mit niedrigen Periostinwerten (28).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Periostin sowohl durch IL-4 und IL-13 als auch durch TGF-beta induzierbar ist. Es besteht eine Interaktion zwischen Periostin und ECM-Proteinen, was in der Pathogenese der Fibrose von Bedeutung ist. Es wurde gezeigt, dass Periostin auf die Migration, Chemotaxis und Adhäsion von Eosinophilen einwirkt und somit eine TH2-Inflammation verstärkt. Auf der anderen Seite lässt sich Periostin eine protektive Komponente zuschreiben, indem es inhibierend auf die Mucus-Bildung einwirkt. Im Falle von epidermalen Keratinozyten verstärkt und unterhält Periostin die TH2-Inflammation.

1.8.4 Chemokine (C-C motif) Ligand 26 (CCL 26) oder MIP 4, Eotaxin-3

Das *CCL*26-Gen ist eines von zwei Cys-Cys (CC)-Zytokin-Genen auf dem langen Arm von Chromosom 7. Das CCL26-Protein ist ein kleines, zur CC-Chemokinfamilie zughöriges Zytokin, auch Eotaxin-3 oder Makrophage Inflammatory Proteine 4-alpha (MIP4) genannt. Die CC-Chemokine sind durch zwei aneinander grenzende Cysteine charakterisierte Proteine.

Der Rezeptor für CCL-Proteine, der CC-Chemokin-Rezeptor3, wird präferentiell auf Eosinophilen exprimiert (78).

CCL26 wird von unterschiedlichen Geweben exprimiert, eingeschlossen Herz, Ovarien und Lunge sowie endotheliale Gewebe. CCL26 wirkt stark chemotaktisch auf eosinophile und basophile Granulozyten; vermittelt wird dieser Effekt durch Bindung an den genannten Chemokinrezeptor CCR3 auf der Zelloberfläche. Hierdurch ermöglicht bzw. unterstützt CCL26 eine Rekrutierung und Akkumulation von eosinophilen Granulozyten im allergischen Entzündungsgeschehen.

Verschiedene Studien (78, 2, 102) weisen eine Induzierbarkeit von CCL26 durch die Interleukine 4 und 13 nach.

1.8.5 Mucine

Mucine können grob in zwei Gruppen, nämlich einerseits die der membrangebundenen sowie andererseits die der löslichen, sezernierten Mucine eingeteilt werden. Grundsätzlich ist der zentrale Bestandteil eines Mucins ein in hohem Maße glycosyliertes Protein. Die O-glycosidisch gebundenen Polysaccharide machen typischerweise einen Massenanteil von 60 – 80 % des Gesamtmasse des Mucins aus. Mit einer molekularen Masse um ca. 120 x 10^6 Dalton sind Mucine äußerst große Moleküle. Sialyl- und Sulfatgruppen sowie Hydroxygruppen innerhalb der Polysaccharide begründen deren anionischen Charakter, aufgrund dessen die Mucine viel Wasser an sich binden können, woraus die gelartige Konsistenz resultiert. Alle bisher bekannten Mucine enthalten im Serin-, Threonin- und Prolin-reichen Zentralprotein mehrere Tandem-Repeat-Domänen, an denen die Polysaccharide kovalent durch O-Glycosylierung gebunden sind. Die üblicherweise mit einem N-Acetylgalactosamin beginnende Polysaccharidkette besteht aus ca. 5 – 10 Einfachzuckern. Mucine sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden, wodurch lineare Mucinketten mit der zwanzigfachen Masse eines einzelnen Mucins entstehen.

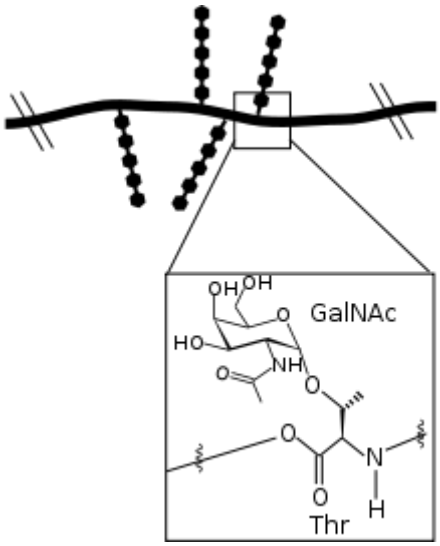


Abb. 25: Chemische Struktur der Mucine. Analog Xu, R. (167)

Die Mucine MUC5AC und MUC5B gehören zu der Gruppe der sezernierten, löslichen, Gel-formenden Mucine.

1.8.5.1 Mucin 5 AC

Mucin 5AC ist ein polymeres Mucin bestehend aus einer N-terminalen Region, einer zentralen Region sowie einer C-terminalen Region. Die N-terminale Region enthält Cystein-reiche Domänen ähnlich dem von Willebrand-Faktor und ist verantwortlich für die über Disulfidbrücken vermittelte Polymerformation. Die zentrale Region enthält eine größere Anzahl potentieller Stellen für eine O-Glycosilierung durch Oligosaccharide. Die C-terminale Region enthält wiederum Cystein reiche vWF-ähnliche Domänen sowie eine Spaltstelle zur autokatalytischen Proteolyse.

*MUC*5AC wird stark exprimiert durch die Becherzellen des respiratorischen Epithels. Darüber hinaus wird MUC5AC ebenfalls in signifikanter Menge angetroffen in der Magenschleimhaut, im Pankreas, der Cervix sowie der Gallenblase.

Unter pathologischen Bedingungen kann die *MUC*5AC-Expression verändert werden. Die Änderungen der Expression sind assoziiert mit neoplastischer Transformation sowie mit inflammatorischem Geschehen und können induziert werden durch die Aktivierung von Signalwegen als Antwort auf verschiedene Faktoren bzw. Stimuli wie inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren oder auch bakterielle Produkte.

MUC5AC ist ein Gel-formendes Mucin und stellt den Hauptbestandteil des Schleims sowohl des respiratorischen Traktes als auch des Magens dar. Auf der Oberfläche des normalen, gesunden respiratorischen Epithels wird die Zusammensetzung des Mucus und damit die rheologischen Eigenschaften des Schleims, der je nach Zusammensetzung eine kritische Funktion in der Abwehr von Pathogenen und umweltbedingten Belastungen hat, insbesondere durch den Anteil von MUC5AC definiert.

Bezüglich der genauen Mechanismen der Regulation von MUC5AC scheinen noch nicht alle Fragen abschließend geklärt. Unterschiedliche Studien zeigen insbesondere zur Induzierbarkeit durch IL-13 teils widersprüchliche Ergebnisse. Thai et al. (148) zeigte an Mäusen, dass eine intratracheale Instillation von IL-13 eine signifikante Induktion von *Muc*5AC sowie *Gob*5, des Maus Homolog des humanen *CLCA*1 hervor rief. In STAT6 Knockout-Mäusen blieb diese Induktion aus. Eine Wiederholung der *MUC*5AC-Expression in vitro mit primären tracheobronchialen Epithelzellen (TBE) war nicht möglich, eine Induktion von *CLCA*1 konnte jedoch gesehen wurde. In früheren Studien war eine Induzierbarkeit von *CLCA*1 durch IL-13 über den JAK/STAT6-Signalweg nachgewiesen worden. Eine *MUC*5AC –Expression konnte hingegen durch ein bakterielles Produkt - das Peptidoclycan - gesteigert werden, ohne dass eine Induktion von *CLCA*1 beobachtet wurde. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass es bezüglich dieser zwei Biomarker für die Metaplasie der Mucus-produzierenden Zellen unterschiedliche Regulationen, nämlich über

einen JAK/STAT6-abhängigen Signalweg sowie über einen diesbezüglich unabhängigen Signalweg gibt.

Es ließ sich nachweisen, dass eine Überexprimierung von *CLCA*1 ebenfalls die Expression von *MUC*5AC in NCI-H292-Zellen steigern konnte, wohingegen eine Herabregulation von *CLCA*1 auch zu einer Herabregulation von *MUC*5AC führte. Diese Ergebnisse lassen es plausibel erscheinen, dass CLCA1-Proteine auch eine funktionale Wirkung in der Heraufregulation der Expression von *MUC*5AC-Genen im respiratorischen Epithel besitzt (110).

Im Falle des Asthma bronchiale stehen TH2-Zytokine wie IL-4, IL-9 und IL-13 im Verdacht, direkt eine *MUC*5AC Expression in Atemwegsepithelzellen zu verursachen. Unter den TH2-Zytokinen scheint insbesondere IL-13 eine prominente Rolle in der Verursachung des Phänotyps zu spielen (27, 162), während für IL-4 und IL-9 nachgewiesen wurde, eine Mucin-Expression in vivo sowie auch in vitro zu induzieren; die letztgenannten Zytokine scheinen jedoch keine kritische Rolle in der Mucus-Zell-Hyperplasie zu haben (86, 100, 160). Die Fähigkeit von IL-13, eine *MUC*5AC-Expression in Atemwegs-Epithelzellen direkt zu induzieren, bzw. die zugrundeliegenden Mechanismen und Signaltransduktionswege sind nicht vollständig geklärt. So gibt es diesbezüglich teils widersprüchliche Studien (86, 24, 128, 83). Letztlich mag dieser Umstand der Tatsache geschuldet sein, dass verschiedenste Zelllinien verwendet wurden, die Kulturbedingungen sich stark unterschieden sowie die Dauer der Behandlung mit IL-13. Im Mausmodell jedoch ist eine Induzierung von *Muc*5AC durch IL-13 möglich.

Zhao et al. (173) beschreiben eine Induzierung der 15-Lipoxygenase1 durch IL-13 und über deren Produkte eine Erhöhung der Expression von *MUC*5AC. Hohe Level von 15-Lipoxygenase1 - induziert durch IL-13 - könnten also auch einen Beitrag zum beobachteten Anstieg des MUC5AC im Asthma bronchiale leisten.

1.8.5.2 MUC 5B

Mucin 5B stellt ein Gel-formendes, sezerniertes Mucin dar, das zu den schmierenden und viscoelastischen Eigenschaften des Speichels wie auch des Mucus im respiratorischen Trakt beiträgt. Hauptproduktionsort sind die submukösen Drüsen. Über mehrere Ser/Thr-reiche Tandem-Repeat-Regionen sind Polysaccharide durch O-Glycosylierung an das Protein gebunden. Ähnlich dem MUC5AC können die einzelnen Mucinmoleküle über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sein, wodurch sich das Auftreten linearer Mucinketten mit dem zwanzigfachen an Masse des einzelnen Mucins erklärt.

Defekte im *MUC*5B Gen - einhergehend mit einer Dysregulation in der Expression und Synthese des Proteins - scheinen assoziiert zu sein mit der Anfälligkeit betroffener Individuen für idiopathische Lungenfibrose. Eine Heraufregulation von *MUC*5B wurde im Zusammenhang mit Erkrankungen wie chronischer Rhinosinusitis oder COPD oder auch Helicobacter-Pylori assoziierter Gastritis gefunden.

Unter den fünf sezernierten Gel-formenden Mucinen werden nur MUC5AC und MUC5B in signifikanten Mengen in den pulmonalen Atemwegen produziert. MUC5B ist das mengenmäßig wichtigste Gel-formende Mucin in den kleinen Atemwegen und erfüllt daher möglicherweise homöostatische Clearance-Funktionen (121). Im Gegensatz dazu ist MUC5AC das im inflammatorischen Geschehen quantitativ am stärksten heraufregulierte Gel-formende Mucin.

Da MUC5B homöostatische Funktionen zu erfüllen scheint und ein heraufreguliertes MUC5AC am ehesten für die pathophysiologischen Folgen, nämlich die Überproduktion zähen Schleims, verantwortlich ist, könnte es – so zumindest der Ansatz aktueller Studien – möglich sein, MUC5AB selektiv zu inhibieren, ohne die Atemwegsfunktion zu beeinträchtigen (36).

Letztendlich bleibt einiges bezüglich der Regulation und der Steuerung der Expression von Mucinen im Entzündungsgeschehen unklar. Jedoch erscheint

eine quantitative Veränderung in der Expression der zwei wichtigen Atemwegsmucine MUC5AC und MUC5B nachvollziehbar, wobei in der Atemwegsreaktion des Asthma bronchiale eine überproportionale Erhöhung der Expression des MUC5AC ausschlaggebend zu sein scheint, wie verschiedene Studien belegen konnten (84, 93, 118).

1.8.6 Carboxypeptidase A3

Unter den 22 bis 23 Mitgliedern der Genfamilie der Metallocarboxypeptidasen ist die Carboxypeptidase A3 ein von Mastzellen sezerniertes Enzym mit der Funktion einer Exopeptidase. CPA3 wird von Mastzellen zusammen mit Endopeptidasen wie Tryptasen oder Chymase sezerniert. CPA3 katalysiert die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen von Aminosäureresten mit aliphatischen oder aromatischen Seitenketten vom C-terminalen Ende aus bei einem pH-Optimum im neutralen bis basischen Bereich. Carboxypeptidase A3 gehört zu den Metalloproteasen mit einem Zinkion im aktiven Zentrum.

Aktuelle Studien konnten nachweisen, dass sowohl die Mastzell-Tryptase als auch die Carboxypeptidase A3 im Atemwegsepithel von Asthmapatienten differentiell exprimiert wird (31).

Mittels der statistischen Methode des Unsupervised Clustering kann nachvollzogen werden, dass die Genexpression von *CPA*3 in Mastzellen des Atemwegsepithels in engem Zusammenhang steht zur Expression von Genen der IL-13-Signatur bzw. IL-13 induzierbaren Genen. Die Level der Expression von Mastzellgenen korrelierten positiv mit der Verbesserung der Lungenfunktion durch inhalative Cortikosteroide. Die intraepitheliale Mastzelldichte zeigt sich in Patienten mit TH2-hoch-Asthma / im TH2-Endotyp zweifach höher als normal verglichen mit TH2-niedrig-Asthmapatienten oder gesunden Kontrollen. Diese aus TH2-hoch-Individuen beschriebenen Mastzellen lassen sich durch die Expression von Tryptase und im Speziellen durch die Expression von

Carboxypeptidase A3, jedoch erstaunlicherweise nicht durch die Expression von Chymase charakterisieren (31).

IL-13 induziert die Expression des Stammzellfaktors in kultivierten Atemwegs-Epithelzellen. Mastzellen, die dem Medium der IL-13 aktivierten Epithelzellen ausgesetzt werden, zeigen eben jene besondere Konstellation der Herabregulierung von Chymase, jedoch keine Änderung bezüglich Tryptase- oder CPA3-Expression (31).

Die intraepitheliale Mastzellanzahl in Individuen des TH2-Endotyps ist zum einen gesteigert, zum anderen zeigen diese Mastzellen einen ungewöhnlichen Protease-Phänotyp, nämlich eine gesteigerte Synthese von Tryptase und CPA3 und bemerkenswerterweise eine Reduzierung der Synthese von Chymase. Darüber hinaus vermag die intraepitheliale Mastzellanzahl die Ansprechbarkeit gegenüber inhalativen Cortikosteroiden vorhersagen. IL-13 stimulierte Produktion des Stammzellfaktors durch Epithelzellen kann möglicherweise einen Beitrag zur Erklärung der Akkumulation von Mastzellen in TH2-hoch-Asthma Atemwegsepithelien leisten, die eben jene besondere Konstellation an exprimierten Peptidasen aufweisen (31).

1.8.7 Osteopontin

Osteopontin (*OPN*) ist ein von diversen Immunzellen sowohl in einer sezernierten als auch in einer intrazellulären Form exprimiertes Phosphoglycoprotein. Es wird durch ein gleichnamiges Gen kodiert, das sich auf dem langen Arm von Chromosom 4 befindet (4q13) und besteht aus etwa 300 Aminosäuren. Osteopontin entsteht in einer Vielzahl von Zellen, wie unter anderem Osteoblasten - wo es initial beschrieben wurde - jedoch wird es ebenfalls von den meisten Zellen des Immunsystems synthetisiert wie vornehmlich T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophilen und

Eosinophilen, NK-Zellen, Mastzellen, dendritischen Zellen wie auch Strukturzellen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Epithelzellen.

Ein wichtiges funktionelles Charakteristikum ist die Fähigkeit, Integrine zu binden. Diese Eigenschaft wird über das RGD-Motiv vermittelt (10).

Grundsätzlich vermag Osteopontin - geschuldet der Fähigkeit diverse ubiquitär exprimierte Zelloberflächenrezeptoren zu binden - einen aktiven Mediator in physiologischen wie auch pathologischen Prozessen darzustellen und zwar Funktionen wie Zelladhäsion, Migration und Zellzyklus, Chemotaxis, Zellaktivierung und Apoptose betreffend. Vor diesem Hintergrund ist es in vielfältige Prozesse eingebunden wie unter anderem (Knochen-) Remodeling, Tumorangiogenese, Muskelerkrankungen, Wundheilung und insbesondere eben auch in regulierende und steuernde Prozesse und somit letztendlich Wirkungen des Immunsystems (155).

Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass es eine Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, bei der Entstehung malignen Wachstums sowie Allergie und Asthma (169, 76, 23, 166, 139, 131, 69).

Die genaue Rolle von Osteopontin im allergisch-inflammatorischen Geschehen lässt jedoch noch viele Fragen offen.

Osteopontin scheint nach neuesten Studien eine Bedeutung in der TH1-Zell-vermittelten Immunität zu besitzen, jedoch bleibt die Bedeutung in der TH2-assoziierten allergischen Antwort – insbesondere dem Asthma – teilweise unklar (171). Die Untersuchung in den drei Asthma-Subgruppen bezüglich des Schweregrads der Erkrankung mild, moderat und schwer sowie einer Gesundkontrolle erbrachte den Nachweis, dass die Osteopontin-Proteinkonzentration im Serum in allen drei Gruppen signifikant höher imponierte, als in der gesunden Kontrollgruppe, es also keine signifikante Assoziation zwischen der Osteopontin-Serumkonzentration und der Krankheitsschwere zu geben scheint (171).

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse anderer Studien: (29) Osteopontin-Level erscheinen signifikant erhöht in schwerem, steroidrefraktärem Asthma gegenüber moderaten, steroidnaiven Verlaufsformen oder gesunden Kontrollen. Hier ist jedoch anzumerken, dass die Osteopontin-Level nicht im Serum, sondern im induzierten Sputum gemessen wurden. Eine Regressionsanalyse der hier (29) erhobenen Daten zeigte eine signifikante Assoziation zwischen log OPN und Sputum-Eosinophilen, Cysteinyl-Leukotrienen, IL-13, TGF-beta1 und ECP. Diese Assoziationen ließen sich allerdings nicht in milden Verlaufsformen oder Gesunden beobachten. Die Osteopontin-Level erscheinen im induzierten Sputum also in schweren Verlaufsformen signifikant höher zu sein als in moderaten oder milden Formen, darüber hinaus erscheint die Höhe der Osteopontin-Level assoziiert zu sein mit Mediatoren, die eine Bedeutung haben in Prozessen der Inflammation und des Remodelings wie beispielsweise TGF beta1 oder IL-13. Jedoch beschränkt sich diese Beobachtung auch nur auf schwerere Verlaufsformen.

Weitere aktuelle Studien auf dem Gebiet des Zusammenhangs zwischen Osteopontin und Asthma (131) untersuchten Serum und bronchoalveolare Lavage-Flüssigkeit sowie bronchoskopische Gewebeproben bezüglich ihrer Osteopontin-Level. Während einer Exazerbation imponierten die Serum- Level bemerkenswerterweise erniedrigt, jedoch zeigten sie sich, ebenso wie die Werte in der Lavage, erhöht im Steady State, und dies in allen Schweregeraden.

Anhand von bronchoskopisch gewonnenen Proben kann eine Heraufregulation von Osteopontin im bronchialen Gewebe beobachtet werden. Hier wird es exprimiert durch Epithelzellen, glatten (Atemwegs-) Muskelzellen, Myofibroblasten, T-Lymphozyten und Mastzellen. Die gemessenen Osteopontin-Level korrelieren mit der Dicke der retikulären Basalmembran. In Bezug auf die gewonnenen subendothelialen Entzündungszellen zeigte sich hier eine höhere *OPN*-Expression bei schwerem Asthma verglichen zu moderaten oder milden Formen. Bei Verwendung von Lavage-Flüssigkeit oder bronchoskopischen

Proben scheint es Evidenz für die Heraufregulierung der *OPN*-Expression zu geben, weiterhin eine Assoziation mit Veränderungen das Remodeling betreffend sowie eine Korrelation der Expression in subendothelialen Zellen mit der Krankheits-Schwere.

Bezüglich der Regulation und Induzierbarkeit von Osteopontin in Monozyten konnten gegensätzliche Wirkungen von IL-10 auf der einen Seite und verschiedenen TH2-Zytokinen auf der anderen Seite beobachtet werden (87). Nachweislich lässt sich Osteopontin dosisabhängig durch IL-10 induzieren, und durch IL-4 und IL-13 inhibieren.

Frenzel et al. (45) schreiben Osteopontin neben Zytokineigenschaften auch chemotaktische Funktionen und weitere Funktionen in verschiedenen Signalwegen zu, die TH1 und TH17 gesteuerte Immunreaktionen verstärken und vor Apoptose schützen. Im Falle des allergischen Asthma verstärkt Osteopontin die Sensibilisierung gegenüber einem Antigen, moduliert jedoch die TH2-gesteuerte, IL-4 dominierte Antwort herunter. Eine *OPN*-Expression wird vermehrt beobachtet während spezifischer Immuntherapie bzw. Hyposensibilisierungstherapie, nicht zuletzt einem TH2-Antwort unterdrückenden Effekt von Osteopontin geschuldet (45). In TH1-getriebenen Entzündungstypen wird Osteopontin von T-Effektor-Zellen und Keratinozyten sezerniert und unterstützt die Migration dendritischer Zellen und die Expression von IL-12, mit der Folge, dass eine TH1-vermittelte Allergie bzw. Inflammation sowie die Chronifizierung vorangetrieben wird.

Zusammenfassend scheint zu konstatieren zu sein, dass sezerniertes Osteopontin gegenteilige, teils widersprüchliche Effekte auf TH2-Antworten und somit die nachfolgende (Atemwegs-)erkrankung hat: proinflammatorisch in Bezug auf die primäre systemische Sensibilisierung, antiinflammatorisch während der sekundären pulmonalen Antigen-Challenge. Dies scheint

hauptsächlich durch die Regulation verschiedener Subsets dendritischer Zellen vermittelt zu werden (166).

Osteopontin stellt insofern eine wichtige Komponente der frühen Typ-1 bzw. Zell-vermittelten Immunantwort dar.

Osteopontin, welches im Asthma vermutlich in allen Schweregeraden heraufreguliert wird, ist offensichtlich assoziiert mit Prozessen des Remodelings; eine Osteopontindefizienz schützt vor Remodeling und Hyperreagibilität (139), die subepitheliale Expression korreliert mit der Schwere der Erkrankung (131).

Insofern könnte Osteopontin sich eventuell als Biomarker auf dem Gebiet des Remodelings eignen. Durch seine Supprimierbarkeit durch IL-13, also seine Supprimierbarkeit bei einer TH2-Antwort möglicherweise auch als inverser Biomarker.

2. Fragestellung

Da es, wie aus den vorhergegangenen Ausführungen und Überlegungen hervorgeht, ganz offensichtlich grundlegend unterschiedliche Phänotypen, nämlich verschiedene zytologisch charakterisierte Phänotypen sowie verschiedene molekular definierte Phänotypen, die sogenannten Endotypen, in der Immunpathogenese des Asthma bronchiale gibt, müssen diagnostische Strategien entwickelt werden, diese auch sicher zu identifizieren und zu differenzieren. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass die unterschiedlichen Endotypen auch auf unterschiedliche Therapieansätze reagieren oder eben auch nicht reagieren, muss zum Zwecke der Therapiestratifizierung eine zuverlässige Unterscheidung der jeweiligen Subpopulationen ermöglicht werden. Gerade eine Vielzahl von in Erprobung befindlichen molekularen, Target-basierten Therapien kann nur dann wirksam sein, wenn auch ein entsprechender Signalweg in der Pathogenese beschritten wird, in welchem die jeweiligen therapeutischen Targets auch eine Funktion innehaben.

Das Interleukin-13-induzierbare Protein Periostin stellt einen ersten vielversprechenden Biomarker dar, das Interleukin-13 selbst ein potentiell wirksames TH2-Target. Doch zum Stratifizieren dieser Subgruppen werden einfach zu gewinnende und einfach wie auch zuverlässig zu messende Biomarker benötigt, die keinen großen Kostenaufwand verursachen. Diese Aufgabe könnten möglicherweise unterschiedlich exprimierte Plasmaproteine erfüllen.

Die zur Unterscheidung verschiedener molekularer Endotypen herangezogenen Biomarker müssen zur Unterscheidung der jeweiligen Subgruppen eine statistische Signifikanz bezüglich ihrer Wertelage bzw. ihres Expressionslevels in der jeweiligen TH2-hoch oder TH2-niedrig-Population aufweisen, um einen TH2-Endotypen zu identifizieren.

Einige Proteine, welche im Vorausgegangenen näher beschrieben wurden, bieten sich hierzu möglicherweise an.

Doch im ersten Schritt müssen brauchbare und zuverlässige Testsysteme zur Messung dieser Proteine evaluiert und etabliert werden.

Anhand der oben dargestellten aktuellen Studien und den daraus gewonnenen Erkenntnissen sollen die vorgeschlagenen potentiellen Marker genauer bezüglich ihrer Eignung als Biomarker überprüft werden. Durch genauere Betrachtung ihrer bislang bekannten Funktion, Effekte, Induzierbarkeit und ihrer Rolle im Entzündungsgeschehen und anhand ihrer Struktur, Verteilung und eben insbesondere ihrer Stellung im Inflammationsprozess sowie ihrer Assoziation zu und ihrer Korrelation mit bestimmten Asthma-Phänotypen soll ihre Eignung kritisch hinterfragt werden. Von der Rationalen aus soll geprüft werden, ob sich die Serumkonzentration des diskutierten Proteins überhaupt als Surrogatmarker für eine TH2-Entzündung eignet.

Zusammenfassend sollen folgende Hypothesen untersucht werden:

- Die ELISA-Tests genügen allgemeinen, einschlägigen Gütekriterien (149) und generieren vor Ort stabile und verlässliche Messwerte.
- Die als Biomarker zur Diskussion stehenden Proteine sind systemisch im peripheren Blut messbar.
- Serum und Plasma sind geeignete Spezimen.
- Die Proteine genügen aufgrund ihrer Beschaffenheit, Messbarkeit, ihrer Funktion im Inflammationsgeschehen sowie aufgrund ihres Verteilungsraumes den Anforderungen an einen einfach zu messenden Biomarker zur Identifikation eines TH2-Endotyps.

Die letztgenannte Hypothese soll zum großen Teil auch durch die Sichtung und Zusammenfassung der in der jüngeren Literatur zu diesen Themen gefundenen Ergebnissen von einer theoretischen Warte aus näher untersucht und beurteilt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten und Kontrollen

Zum Zwecke der Evaluation geeigneter ELISA-Testsysteme wurden zunächst vier Testgruppen definiert. Die ELISA-Systeme sollen in den vier Untergruppen

a) Gesunde Kontrolle

b) Patienten mit einer akuten Inflammation

c) Patienten mit einer Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis bzw. deutlich erhöhten IgE-Serumspiegeln und

d) für den Testparameter PAI 2 auch Schwangere

ausgetestet werden.

Nach Antragstellung bei der zuständigen Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und Vorlage eines Studienplans sowie entsprechender Patienten- und Probandenaufklärungen wurde ein positives Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 132/13 erteilt.

Die folgende Tabelle gibt die Ein- und Ausschluss-Kriterien an.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien.

	Einschluss Kriterien	Ausschlusskriterien
Kontrolle	Gesunde Personen	Asthma bronchiale Stoffwechselerkrankungen insbes. Diabetes mellitus Angeborene oder erworbene Immundefizienz Atopische Erkrankung Autoimmunerkrankung Chronische Infektionskrankheit Erkrankungen der Leber, der Nieren, des Herz-Kreislaufssystems akute Inflammation CRP > 1,0 mg/l
akute Inflammation	CRP > 100 mg/l länger als drei Tage oder CRP > 20 mg/l länger als eine Woche mit einer einmaligen Spitze von > 100 mg/l unabhängig von der Ursache (Infektion oder sonstige)	Abwesenheit einer akuten Entzündung
Atopie	IgE > 100 U/ml, Sensibilisierung auf mind. eins der klassischen Atopieallergene Katze, Milbe, Gras	IgE < 100 U/ml
Schwangere	physiologische Schwangerschaft	pathologische Zustände

3.3 Patientencharakteristika

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Anzahl der akquirierten Proben sowie über die Charakteristika der Probanden bezüglich Alter, Geschlecht etc. sowie über das Vorliegen und die Art von Grunderkrankungen.

Tabelle 4: Patientencharakteristika.

	Kontrolle	akute Inflammation	Atopie
Proben [n]	14	14	8
Alter [Jahre]	23 bis 31	37 bis 91	24 bis 85
Median [Jahre]	25	69	55
Frauen [n]	7	5	4
Männer [n]	7	9	3
Grunderkrankung	keine	SIRS oder Sepsis auf dem Boden bösartiger Neoplasien, postoperativer Komplikationen, Multimorbidität (KHK/ACS , met.Syndrom, Niereninsuffizienz, Leberzirrhose, Peritonitis, ARDS, etc.) CRP größer 100 mg/l länger als eine Woche	Grunderkrankungen des atopischen Formenkreises, keine parasitären Grunderkrankungen

3.4 Präanalytik

Die Blutentnahme bei den Probanden erfolgte unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien durch eine Venenpunktion State oft the art. Verwendet wurden neben einem handelsüblichen Venenpunktionsset 7,5 ml Lithium-Heparin- und Serum-Monovetten der Firma Sarstedt.

Nach abgeschlossener Gerinnung im Serum wurden alle Röhrchen 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Aliquotierung von Serum bzw. Heparin-Plasma in Sekundär-Röhrchen (500 µl Eppendorf-Cups). Alle Aliquots wurden bei -20°C eingefroren und innerhalb von 2 Monaten abgearbeitet. Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen wurden soweit möglich vermieden.

Vor der Abarbeitung wurden die Sekundär-Cups langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und erneut ab zentrifugiert.

3.5 Definitionen und Berechnungen

3.5.1 Limit of Detection (LOD):

Das Limit of Detection (LOD), bzw. die Nachweisgrenze, bezeichnet denjenigen unteren Wert eines Messverfahrens, bis zu dem die Messgröße gerade noch zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Der Messwert an der Nachweisgrenze hat eine erhöhte Ungenauigkeit, die aber ein vorgegebenes statistisches Konfidenzintervall, nämlich das der dreifachen Standardabweichung des Probenleerwertes, nicht überschreitet. Messwerte, die eine größere Ungenauigkeit aufweisen als das vorgegebene Intervall, werden, da sie außerhalb der Nachweisgrenze liegen, im Sinne der Messtechnik als unmessbar bzw. nicht nachweisbar bezeichnet.

Das Kriterium des „zuverlässigen Nachweises“ wird in der Regel bezogen auf die Präzision des Messverfahrens bei einer Blank-Messung oder Leermessung, also den Mittelwert wiederholter Leermessungen. Eine Messung gilt dann als Nachweis, wenn der Messwert mindestens drei Standardabweichungen über der Nullmessung liegt.

$$LOD = \mu_B + 3\sigma_B$$

- μ_B: Mittelwert des Blindwertes
- σ_B: Standardabweichung des Blindwertes

(30)

3.5.2 Limit of Quantification (LOQ):

Das Limit of Quantification (LOQ) oder die Bestimmungsgrenze eines Messverfahrens ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer gegebenen (Mindest-) Präzision gemessen werden kann. Erst oberhalb der Bestimmungsgrenze wird die Angabe quantitativer Analysenergebnisse möglich. Analog zur Nachweisgrenze wird das Kriterium der gewünschten Genauigkeit bezogen auf die Präzision des Messverfahrens bei einer wiederholten Leermessung in Form der neunfachen Standardabweichung.

Insofern gilt ein Messwert als quantitativ (bestimmt), wenn die Genauigkeit der Messung um den Faktor drei höher (besser) ist als die Genauigkeit der Nachweisgrenze.

Grob genähert entspricht die Bestimmungsgrenze somit dem dreifachen Wert der Nachweisgrenze.

$$LOQ = \mu_B + 9\,\sigma_B$$

- μ_B: Mittelwert des Untergrundsignals bzw. Blindwertes
- σ_B: Standardabweichung des Untergrundsignals bzw. Blindwertes

(30)

3.5.3 Variationskoeffizient (VK oder VC), Standardabweichung:

Der Variationskoeffizient stellt in der deskriptiven Statistik eine statistische Kenngröße dar, welche im Gegensatz zur Varianz ein relatives Streuungsmaß ist, also unabhängig ist von der Maßeinheit der statistische Variablen bzw. Zufallsvariablen.

Der Variationskoeffizient ist eine Normierung der Varianz: Ist die Standardabweichung größer als der Mittelwert bzw. der Erwartungswert, so ist der Variationskoeffizient größer 1.

Der Variationskoeffizient für eine Zufallsvariable ist definiert als die relative Standardabweichung, d. h. die Standardabweichung dividiert durch den Erwartungswert einer Zufallsvariablen X. In der Regel wird der Variationskoeffizient in Prozent angegeben. Liegt an Stelle der Verteilung der Zufallsvariablen eine konkrete Messreihe von Werten $x_1, \ldots, x_n$ vor, so bildet man analog den empirischen Variationskoeffizienten als Quotienten aus empirischer Standardabweichung σ und arithmetischem Mittelwert $\overline{x}$:

$$VK = \frac{\sigma}{\overline{x}} \quad (85).$$

Die Standardabweichung ist ein Maß dafür, wie weit die einzelnen Merkmalsausprägungen der Stichprobe verteilt sind. Sie gibt sie an, wie weit die einzelnen Messwerte im Durchschnitt von dem Erwartungswert (bzw. Mittelwert) entfernt sind. Die Standardabweichung ist definiert als die Quadratwurzel der Varianz.

$$\sigma = \sqrt{Var\,(x)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \mu)^2}{n}} \quad \text{bzw. } S = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \mu)^2}{n-1}}$$

Dabei ist

- $\boldsymbol{\sigma}$ die Standardabweichung
- **S** die Schätzfunktion für die Standardabweichung $\boldsymbol{\sigma_x}$ der Grundgesamtheit
- **n** der Stichprobenumfang (Anzahl der Werte)
- $\boldsymbol{x_i}$ die Merkmalsausprägungen am *i*-ten Element der Stichprobe
- $\mu = \overline{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$ der empirische Mittelwert, also das arithmetische Mittel der Stichprobe.

3.5.4 Intraassay - within imprecision und Interassay / Interassay - total imprecision:

Intra- und Interassay-Varianz sind wichtige Kenngrößen für die Präzision einer Messmethode. Sie geben an, wie groß die analytische Streuung ist. Diese wird im Variationskoeffizienten in VK% oder VC% (siehe oben) ausgedrückt. Die Intraassayvarianz gibt Auskunft wie groß die Abweichung innerhalb eines Messdurchlaufs ist (Mehrfachbestimmung eines Analyten aus derselben Probe im gleichen Lauf), während als Interassayvarianz die Messabweichung definiert wird, wenn an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen der gleiche Parameter aus der selben Probe bestimmt wird (85).

3.5.5 t-Test, Varianzanalyse (ANOVA), p-Werte

t-Test

Der t-Test (in diesem Falle Zweistichproben-t-Test) dient dem Vergleich von Mittelwerten von zwei Untergruppen einer Stichprobe, er prüft mit Hilfe der Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ zweier Stichproben, ob die Mittelwerte μ_1 und μ_2 der zugehörigen Grundgesamtheiten verschieden sind. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Daten der Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Im einfachsten Fall prüft der Test

die Nullhypothese, dass die Mittelwerte der Grundgesamtheiten gleich sind $(\mathrm{H}_0 : \mu_1 = \mu_2)$

gegen die Alternativhypothese, dass die Mittelwerte der Grundgesamtheiten ungleich sind $(\mathrm{H}_1 : \mu_1 \neq \mu_2)$

Der t-Test verwendet als Prüfkriterium einen Wert aus der t- oder Student-Verteilung. Dieser Wert lässt sich aus den Stichprobenwerten berechnen.

Die t-Verteilung erlaubt die Berechnung der Verteilung der Differenz vom Mittelwert der Stichprobe zum wahren Mittelwert der Grundgesamtheit. Die t-Werte hängen ab vom Signifikanzniveau und vom Stichprobenumfang n und bestimmen das Vertrauensintervall und damit die Aussagekraft der Schätzung des Mittelwertes. (Die standardisierte Schätzfunktion des Stichproben-Mittelwerts normalverteilter Daten ist nämlich nicht mehr normalverteilt, sondern t-verteilt, wenn die zur Standardisierung des Mittelwerts benötigte Varianz des Merkmals unbekannt ist und mit der Stichprobenvarianz geschätzt werden muss.)

Jetzt berechnet der t-Test wie weit die Mittelwerte der beiden Gruppen, x und y, voneinander verschieden sind, normiert durch die gewichtete Varianz (bei großer Varianz weniger aussagekräftig, als bei kleiner) und multipliziert mit einem Faktor, der die Anzahl der Stichproben/Messergebnisse und somit die Verlässlichkeit der Stichprobe berücksichtigt.

Der t-Wert berechnet sich aus den Stichprobenwerten (Differenz der Mittelwerte bezogen auf die normierte Varianz und Stichprobengröße) als:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2})}} \text{ bzw. } t = \sqrt{\frac{nm}{n+m}} \frac{\bar{x}-\bar{y}}{s}$$

wobei s^2 die gewichtete Varianz ist (abhängig von der Stichprobengröße) bzw. $s = \sqrt{s^2}$ (Standardabweichung)

$$s^2 = \frac{(n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2}{n+m-2}$$

Standardmäßig wird beim t-Test von der Annahme ausgegangen, dass die „wahren" Mittelwerte einer Variablen in zwei Gruppen in der Grundgesamtheit identisch sind. Sind beide Gruppenmittelwerte identisch, ergibt sich ein t-Wert von Null. Hierbei ist zu beachten, dass der t-Wert aus den Stichprobenwerten und nicht aus den Daten einer Vollerhebung berechnet wird. Mittelwerte, Varianzen und andere statistische Größen aus einer Stichprobe stimmen aber höchstens zufällig exakt mit den „wahren" Werten in der Grundgesamtheit überein – in der Regel werden sie, in Abhängigkeit von der Sorgfalt der Messung oder der Genauigkeit des Erhebungsdesigns mehr oder weniger stark von diesen „wahren" Werten abweichen. Bei der Ziehung mehrerer Stichproben ist zu erwarten, dass die erhobenen Varianzen und Mittelwerte also mehr oder weniger stark um die „wahren" Werte herum streuen.

Dieser Gedanke ist wiederum auch auf die t-Werte übertragbar, da sich bei unterschiedlichen Stichproben aus derselben Grundgesamtheit ebenfalls unterschiedliche t-Werte ergeben dürften. Die Schlussfolgerung, die daraus gezogen werden kann ist, dass eine Übereinstimmung der „wahren" Mittelwerte in der Grundgesamtheit durch die Berechnung des t-Wertes nicht unmittelbar erkannt werden muss, da eben mit den besagten Schwankungen in den t-Werten zu rechnen ist. Da die Verteilung von t bekannt ist, lässt sich aber errechnen, mit welcher Wahrscheinlichkeit der t-Wert um ein bestimmtes Ausmaß von dem Wert abweicht, den t bei einer perfekten Übereinstimmung von Stichprobe und Grundgesamtheit angenommen hätte, also die Wahrscheinlichkeit, ein Wert größergleich t zu erhalten, obwohl kein Unterschied besteht. Dies wird auch ausgedrückt durch den p-Wert (siehe unten). Der Flächeninhalt der t-Verteilung ab der Stelle t bis unendlich entspricht also - unter der Voraussetzung H_0 wäre gültig, es also keine Differenz gäbe - der Wahrscheinlichkeit, dass zwar eine Differenz gemessen wird, dies aber nur auf Zufall beruht. (falsch-positives Ergebnis). Diese Fehlerwahrscheinlichkeit ist die Vorgabe des Signifikanzniveaus Alpha.

(125, 38, 16, 17, 26)

Varianzanalyse

Bei der Varianzanalyse handelt es sich um ein multivariates Analyseverfahren zur Aufdeckung von Mittelwertsunterschieden falls mehr als zwei Mittelwertsdifferenzen miteinander verglichen werden sollen.

Die Varianzanalyse untersucht die Wirkung einer oder mehrerer unabhängiger Variablen, der sogenannten Faktoren, auf eine oder mehrere abhängige Variablen. Abhängige Variablen müssen dabei intervallskaliert sein, für die Faktoren ist das nominale Skalenniveau ausreichend. Sie testet für Fälle mit mehr als zwei Gruppen (bei zwei Gruppen lässt sich vereinfachend auch ein t-Test durchführen), inwiefern signifikante Mittelwertunterschiede vorliegen. Der Varianzanalyse liegen daher die folgenden Hypothesen zugrunde:

- Nullhypothese H_0: Alle „wahren“ Mittelwerte der Grundgesamtheit sind gleich
- Alternativhypothese Ha: Mindestens zwei „wahre“ Mittelwerte unterscheiden sich

Die Varianzanalyse ist das bedeutendste Verfahren für die Auswertung von Experimenten, wobei das Wirkungsmodell (welche Variablen sind abhängig, welche unabhängig?) im Voraus bekannt sein muss – was bei Experimenten ja in der Regel auch der Fall ist. (125, 38, 37, 62, 7)

p-Wert

Der p-Wert (auch Signifikanzwert, p-value) ist eine Kennzahl zur Auswertung statistischer Tests. Er steht in enger Beziehung mit dem Signifikanzniveau.

Der p-Wert ist eine Wahrscheinlichkeit und nimmt daher Werte zwischen Null und Eins an. Der Wert wird bestimmt durch die gezogene Stichprobe. Er deutet an, wie wahrscheinlich es ist, ein solches Stichprobenergebnis oder ein noch extremeres zu erhalten, wenn die Nullhypothese wahr ist. Ein häufiges Missverständnis ist die Gleichsetzung dieser Aussage mit der falschen Behauptung, der p-Wert würde angeben, wie wahrscheinlich die Nullhypothese bei Erhalt dieses Stichprobenergebnisses ist. Mit dem p-Wert wird also angedeutet, wie extrem das Ergebnis ist: je kleiner der p-Wert, desto mehr spricht das Ergebnis gegen die Nullhypothese. Es haben sich verschiedene Signifikanzniveaus etabliert, wie 5 %, 1 % oder 0,1 %, die verwendet werden, um Entscheidungen zu treffen, ob die Nullhypothese abgelehnt werden kann. Wenn die Nullhypothese verworfen wird, wird das Resultat als statistisch signifikant bezeichnet. Signifikant bedeutet hierbei lediglich überzufällig. Die Größe des p-Werts gibt keine Aussage über die Größe des wahren Effekts. (13, 52)

3.5.6 Korrelationskoeffizient (r):

Der Korrelationskoeffizient oder die Produkt-Moment-Korrelation (von Bravais und Pearson, daher auch Pearson-Korrelation genannt) ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Er kann Werte zwischen −1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. −1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht linear voneinander ab

Ist für die beiden Zufallsvariablen eine Messreihe von gepaarten Ausprägungen (x_1, y_1), (x_2, y_2), … , (x_n, y_n) bekannt, so wird der empirische Korrelationskoeffizient berechnet durch

$$Kor_e(x,y) = q_e(x,y) = r_{x,y}$$
$$= \frac{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x}_i)^2}\sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y}_i)^2}}$$
$$= \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x}_i)^2 \sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y}_i)^2}}$$

Dabei sind

$\overline{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$ und $\overline{y} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$ die empirischen Mittelwerte anhand der Messreihe.

(46, 62, 178, 85)

3.5.7 Regressionsanalyse

Die lineare Regression ist ein Spezialfall des allgemeinen Konzepts der Regressionsanalyse, mit der versucht wird, eine abhängige Variable durch eine oder mehrere unabhängige Variablen zu erklären – das Beiwort „linear“ ergibt sich dabei daraus, dass die Regressionskoeffizienten (nicht unbedingt auch die Variablen selbst) in diesem Fall in erster Potenz in das Regressionsmodell eingehen.

Einfache Lineare Regression

Ein Spezialfall von Regressionsmodellen sind lineare Modelle. Hierbei spricht man von der einfachen linearen Regression, und die Daten liegen in der Form

$$(y_i, x_i), i = 1, \dots, n$$

vor. Als Modell wählt man

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i$$

man nimmt somit einen linearen Zusammenhang zwischen $x_i$und $Y_i$an. Die Daten y_i werden als Realisierungen der Zufallsvariablen Y_i angesehen, die x_i sind nicht stochastisch, sondern Messstellen. Ziel der Regressionsanalyse ist in diesem Fall die Bestimmung der unbekannten Parameter β_0 und β_1.

(32, 39, 116, 117, 132, 153, 172)

3.5.8 Regressionsgerade, Slope, Intercept

Nach Durchführung einer Regressionsanalyse können die Ergebnisse in Form einer Regressionsgeraden graphisch dargestellt werden. Absolut identische Werte in unterschiedlichen Spezimen oder Verdünnungen oder durch unterschiedliche Methoden generiert würden auf einer Geraden mit der Steigung 1 und dem y-Achsenabschnitt (0/0) zu liegen kommen. Der Schnittpunkt der tatsächlichen ermittelten Geraden mit der y-Achse gibt Auskunft über eine erhöhte bzw. erniedrigte Wertelage in einem des untersuchten Materials, einer der jeweiligen Verdünnungen oder in Bezug auf eine der angewandten Methoden. Die Steigung gibt Hinweise über das Verhalten der Wertelage über einem bestimmten Mess- bzw. Konzentrationsbereich hinweg. Steigung und y-Achsenabschnitt können auch als Slope und Intercept ausgedrückt werden.

Es gilt die Formel: Y = slope * X + intercept, wobei y der Messwert aus dem Spezimen/der Verdünnung/ermittelt durch die Methode a und x der Messwert aus dem Spezimen/der Verdünnung/gemessen durch die Methode b ein und desselben Probanden ist.

(32, 39, 116, 117, 132, 153, 172)

3.6 Beschreibung der ELISAs

3.6.1 Beschreibung der Antikörper

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in den Tests eingesetzten Antikörper (1. und 2. Antikörper bzw. Capture- und Detection-Antikörper) für die untersuchten Proteine. In der Spalte Immunogen werden die verwendeten Standards und somit auch das gebundene Epitop des jeweiligen Proteins angegeben.

Tabelle 5: Beschreibung der Antikörper

Parameter	Capture Antikörper	Detection Antikörper	Immunogen
Periostin	MoAb monoklonal IgG1	polyklonal Ziege anti Maus IgG	rekombinantes humanes Periostin (aa22-836)
MUC 5 AC	MoAb monoklonal IgG1	polyklonal Ziege anti Maus IgG	Aufgereinigtes natives Protein
MUC 5 B	MoAb monoklonal IgG1	polyklonal Ziege anti Maus IgG	rekombinantes humanes MUC5B Fragment
CPA 3	MoAb monoklonal IgG 2a	polyklonal Ziege anti Maus IgG	rekombinantes humanes CPA3 (aa110-417)
CLCA 1	MoAb monoklonal IgG 2b	polyklonal Kaninchen anti Maus IgG	rekombinantes humanes CLCA1 (aa542-643)
Osteopontin	MoAb monoklonal IgG 2a	polyklonal Ziege anti Maus IgG	zwischen aa 17-314 (gesamtes Protein)
CCL 26 (MIP 4) and PAI II	Polyklonal	polyklonal	Rekombinantes CCL26/ PAI2

3.6.2 Beschreibung der Reagenzien und Durchführung der ELISAs

Die Kits der Firma USCN (MUC5AC, MUC5B, Periostin, CLCA1, CPA3) benötigen zur Testdurchführung den jeweiligen spezifischen Standard in Form des jeweiligen rekombinanten, lyophylisierten Proteins (siehe hierzu Tabelle Assaykonfiguration: Immunogen), eine mit dem Capture-Antikörper (1. AK) prä-gecoatete 96-well-Mikrotiterplatte spezifisch für das jeweilige Protein, das Detection Reagent A und B, Substrat (Tetramethylbenzidin), Diluent, Puffer und Schwefelsäure zum Stoppen der Reaktion. Das Detection Reagent A enthält einen biotynilierten Detection Antikörper (2. AK) spezifisch für das jeweilige Protein (siehe Tabelle Assay Konfiguration: Detection Antikörper), das Detection Reagent B enthält mit Avidin konjugierte Meerrettich-Peroxidase.

Es handelt sich bei den Assays um nicht kompetitive Immunoassays im Sandwich-Design. Auf einer mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern gecoateten 96-well Microtiterplatte werden den Herstellerangaben entsprechend Standards und verdünnte Proben aufgetragen und gebunden, mittels eines biotynilierten spezifischen Antikörpers (2. AK) detektiert; nach Hinzugabe von Avidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase und TMB-Substrat kann ein zur jeweiligen Proteinkonzentration proportionales Signal photometrisch bei 450 nm detektiert werden.

Alle Schritte wie Proben- und Reagenzienvorbereitung, Wasch- und Inkubationszyklen wurden exakt den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Die folgenden Tabellen geben synoptisch Auskunft zum einen über die verwendeten Antikörper und Standards sowie über weitere assayspezifische Reagenzien.

Standard und Antikörper

Tabelle 6: Standard und Antikörper USCN

	Standard	Capture Antikörper (auf Titerplatte gecoatet)	Detection Antikörper (im Detection Reagenz A enthalten)
Periostin	rekombinantes humanes Periostin (aa22-836)	MoAb monoklonal IgG1	polyklonal Ziege anti Maus IgG
MUC 5 AC	aufgereinigtes natives Protein	MoAb monoklonal IgG1	polyklonal Ziege anti Maus IgG
MUC 5 B	rekombinantes humanes MUC5B Fragment	MoAb monoklonal IgG1	polyklonal Ziege anti Maus IgG
CPA 3	rekombinantes humanes CPA3 (aa110-417)	MoAb monoklonal IgG 2a	polyklonal Ziege anti Maus IgG
CLCA 1	rekombinantes humanes CLCA1 (aa542-643)	MoAb monoklonal IgG 2b	polyklonal Kaninchen anti Maus IgG

Weitere assayspezifische Reagenzien

Tabelle 7: assayspezifische Reagenzien USCN

Detection Reagenz B	mit Avidin konjugierte Meerrettichperoxidase
TMB-Substrat	Tetramethylbenzidin
Waschpuffer	
Standarddiluent	
Assay Diluent A	
Assay Diluent B	
Stop Solution	H_2SO_4

Die Kits der Firma Shanghai Blue Gene (PAI 2 und MIP4) benötigen zur Durchführung neben einer mit dem 1. Antikörper (Capture-Antikörper) gecoatete 96-well-Mikrotiterplatte einen jeweiligen Standard in unterschiedlichen Konzentrationen, einen mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten polyklonalen Antikörper gegen CCL 26 bzw. mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes PAI-2-Protein. Darüber hinaus werden noch Substrat A und B, Stop-Solution (Schwefelsäure) und Wash-Solution benötigt.

Der Assay für PAI 2 ist ein kompetitiver Immunoassay, jener für MIP4 ein nicht kompetitiver Immunoassay im Sandwich-Design. Nach Applikation der jeweiligen spezifischen Standards und verdünnten Proben auf die mit spezifischem polyklonalen Antikörper gegen CCL-26 bzw. PAI-2 gecoateten 96-well-Mikrotiterplatten erfolgt die Gabe von mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten polyklonalen anti-CCL26-Antikörpern bzw. von mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem PAI-2-Protein. Nach Hinzugabe von entsprechendem Substrat kann photometrisch bei 450 nm ein zur CCL26-Konzentration proportionales Signal und ein zur PAI2-Konzentration umgekehrt proportionales Signal detektiert werden.

Alle Schritte wie Proben- und Reagenzienvorbereitung, Wasch- und Inkubationszyklen wurden exakt den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Die folgenden Tabellen geben synoptisch Auskunft zum einen über die verwendeten Antikörper und Standards sowie über weitere assayspezifische Reagenzien.

Standard und Antikörper

Tabelle 8: Standard und Antikörper BlueGene

	Standard	Capture Antikörper (auf Titerplatte gecoatet)	Detection Antikörper (im Enzymkonjugat enthalten)
CCL 26	rekombinantes CCL 26	polyklonal	polyklonal
PAI 2	rekombinantes PAI 2	polyklonal	

Weitere assayspezifische Reagenzien

Tabelle 9: assayspezifische Reagenzien BlueGene

Enzymkonjugat (CCL 26)	mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte polyklonale anti-CCL26-Antikörpern
Enzymkonjugat (PAI 2)	mit Meerrettichperoxidase konjugiertes PAI 2 Protein
Substrat A	
Substrat B	
Stop Solution	H_2SO_4
Wasch Solution	

Das Kit der Firma Ray Bio (Osteopontin) stellt einen nicht kompetitiven Sandwich-Immunoassay dar und benötigt zur Durchführung neben einer mit anti-human-Osteopontin-Antikörpern gecoateten 96-well Mikrotiterplatte Standards mit rekombinantem humanem Osteopontin, Assay Diluent A und B, biotynilierten anti-human-Osteopontin-Antikörper, Streptavidin-konjugierte HRP, TMB-Substrat sowie H_2SO_4.

Nach Applikation der Standards und verdünnten Proben auf die gecoateten 96-well Mikrotiterplatten erfolgt die Zugabe von biotyniliertem Detection-Antikörper. Durch Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase wird Tetramethylbenzidin enzymatisch umgesetzt, so dass photometrisch bei 450 nm ein zur Osteopontin-Konzentration proportionales Signal erhalten wird.

Alle Schritte wie Proben- und Reagenzienvorbereitung, Wasch- und Inkubationszyklen wurden exakt den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Die folgenden Tabellen geben synoptisch Auskunft zum einen über die verwendeten Antikörper und Standards sowie über weitere assayspezifische Reagenzien.

Standard und Antikörper

Tabelle 10: Standard und Antikörper Ray Bio

Standard	Capture Antikörper (auf Titerplatte gecoatet)	Detection Antikörper
zwischen aa 17-314 (whole Protein)	MoAb monoklonal IgG2a	polyklonal anti human OPN IgG

Weitere assayspezifische Reagenzien

Tabelle 11: assayspezifische Reagenzien Ray Bio

Assay Diluent A	Tierserum mit 0,09% Natriumazid NaN3
Assay Diluent B	
Detection Antibody OPN	biotynilierter anti-human OPN-AK
HRP-Straptavidin	Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin
Substrat	Tetramethylbenzidin
Stop solution	2M H_2SO_4

3.6.3 Cut-off, Detection-Range, Kreuzreaktivität (Herstellerangaben)

Die folgende Tabelle fasst die durch den Hersteller der Kits angegebenen Leistungscharakteristika zusammen.

Tabelle 12: Cut-off, Detection-Range, Kreuzreaktivität (Herstellerangaben)

	Cut-Off	Detection-Range	Kreuzreaktivität	Hersteller
Periostin	1 ng/ml	0,625 - 40 ng/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	USCN
MUC 5 AC	0,3 ng/ml	0,312 - 20 ng/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	USCN
MUC 5 B	0,6 ng/ml	0,312 - 20 ng/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	USCN
CCL 26 (MIP 4)	5 pg/ml	>= 5 pg/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	Shanghai BlueGene
CPA 3	0,15 ng/ml	0,156 - 10 ng/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	USCN
CLCA 1	0,3 ng/ml	0,1569 - 10 ng/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	USCN
PAI 2	1,0 ng/ml	>= 1,0 ng/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet	Shanghai BlueGene
Osteopontin	75 pg/ml	>= 75 pg/ml	Keine Kreuzreaktivität beobachtet*	RAY BIO

*getestet gegen: human Angiotensin, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12p70, IL-12p40, IL-13, IL15, IL-309, IP-10, G-CSF, GM.CSF, IFN-gamma, Leptin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MDC, MIP-1alpha, MIP-1beta, MIP-1delta, PARC, PDGF, RANTES, SCF, TARC, TGF-beta, TIMP-1, TIMP-2, TNF-alpha, TNF-beta, TPO, VEGF

3.7 Geräte und Software

Zur optischen Auswertung der Mikrotiter-Platten fand der ELISA-Reader „Genios“ der Firma Tecan Anwendung, das optische Auslesen erfolgte bei 450 nm. Die Auswertung der Rohdaten und mathematische Transformation in Konzentrationsangaben erfolgte durch die auf den ELISA-Reader abgestimmte Software ebenfalls der Firma Tecan.

Die statistische Auswertung, in Form der Berechnung der Korrelationen, der Varianzen, Variationskoeffizienten, Slopes und Intercepts erfolgte mit Hilfe des statistischen Verfahrens nach Passing und Bablock. Die computergestützte Berechnung erfolgte mithilfe der Statistik-Software EVAPAK der Firma Roche, basierend auf dem Kalkulationsprogramm EXCEL von Microsoft, die Erstellung der Boxplotdiagramme mit zugehörigen Kennziffern (ANOVA, p-Werte) durch die Statistik-Software SPSS von IBM.

Eine Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien, Geräte und Reagenzien gibt folgende Tabelle:

3.8 Weitere Materialien und Reagenzien

Tabelle 13: weitere Materialien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
PBS (Dulbecco´s phosphate buffered saline) pH 7,4 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat (KH_2Po_4) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCL) 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 137 mM Natriumchlorid (NaCL) Destilliertes Wasser	PAA Laboratories GmbH, Parsing, Österreich

Materialien	Hersteller
Blutentnahme Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Li-Heparinat 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serum 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0,5 ml Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1,5 ml Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10 ml Cups	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Cups	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Geräte	Hersteller
Pipetten 1 µl bis 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborzentrifuge	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
Akku-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
Schüttler MTS 2/4	IKA, Koba electronic, Staufen, Deutschland
Washer NUNC Immuno Wash 12	Nalge Nunc international, Roskilde, Dänemark
Inkubator Heraeus Function line	Haraeus, Hanau, Deutschland
ELISA-Reader Tecan Genios	Tecan, Männedorf, Schweiz

Software	Hersteller
EXCEL	Microsoft
Tecan Genios	Tecan
EVA PAK	Roche
SPSS	IBM

4. Resultate

4.1 Validierung der ELISAs, Testcharakteristika und Leistungsdaten

4.1.1 Analytische Sensitivität

Das Limit of Detection beschreibt die absolute untere Grenze, ab der ein Analyt gerade noch detektiert werden kann, also die kleinste messbare Menge, das Limit of Quantification beschreibt die kleinste quantifizierbare Menge. Zu den Berechnungen von LOD und LOQ siehe 3.5.1 und 3.5.2. Messwerte, die sich unterhalb dieser aus den Blank- oder Leermessungen errechneten Grenzen befinden, sind eine Art „Hintergrundrauschen“; hier wird also die untere Grenze des Messbereichs des Systems definiert.

Tabelle 14 zeigt die errechneten Werte für LOD und LOQ, sowie die dazugehörigen errechneten 95%-Konfidenzintervalle.

Die Werte entstammen einer 24-fach durchgeführten Leermessung (Blank) nach einer Berechnung mit den unter 3.5.1 und 3.5.2 angegebenen Formeln.

Tabelle 14: Analytische Sensitivität, LOD und LOQ

Biomarker	Analytische Sensitivität	
	LOD	LOQ
Periostin	1,5 ng/ml	3,9 ng/ml
(95%-KI)	1,42-1,74	3,79-4,11
MUC 5 AC	1,04 ng/ml	2,66 ng/ml
(95%-KI)	0,92-1,16	2,55-2,78
MUC 5B	2,9 ng/ml	7,6 ng/ml
(95%-KI)	2,63-3,25	7,30-7,93
CCL 26 (MIP 4)	0,2 pg/ml	0,65 pg/ml
(95%-KI)	0,20-0,28	0,61-0,69
CPA 3	1,19 ng/ml	3,26 ng/ml
(95%-KI)	1,05-1,35	3,12-3,42
CLCA1	0,61 ng/ml	1,55 ng/ml
(95%-KI)	0,55-0,67	1,49-1,61
PAI II	1,05 ng/ml	2,66 ng/ml
(95%-KI)	0,87-1,24	2,47-2,84
Osteopontin	381 pg/ml	985 pg/ml
(95%-KI)	341,8-420,8	945,8-1024,7

Sämtliche ermittelten LOD und LOQ-Werte sind verhältnismäßig niedrig, wenn auch nicht so niedrig wie vom Hersteller angegeben. Jedoch sprechen sie dafür, dass die Tests von einem Hintergrundrauschen zu unterscheiden vermögen.

4.1.2 Präzision

4.1.2.1 Messpräzision / Intraassay

Zu einem Zeitpunkt wurden auf einer Mikrotiterplatte n Proben mit dem jeweiligen Protein in Mehrfachbestimmung gemessen. Daraufhin erfolgte Berechnung der Variationskoeffizienten, welche ein Maß für die Genauigkeit des Messvorgangs darstellen, nach der unter 3.5.3 und 3.5.4 angegebenen Formeln. Der VK hat den Vorteil, dass er von der Höhe der Messwerte bereinigt ist und somit zum Vergleich sowohl über verschiedene Konzentrationsstufen als auch zum Vergleich unterschiedlicher Tests herangezogen werden kann.

Aus Tabelle 15 gehen für das jeweilige Protein die mittleren, errechneten VKs im Intraassay für Serum und Plasma als auch die Anzahl der analysierten Proben, die Anzahl der jeweiligen Wiederholungen sowie die eingesetzten Konzentrationen hervor.

Tabelle 15: Präzision Intra-Assay

Biomarker	Within run-imprecision [%]		Anzahl		n
	Intra-Assay (VK)	r	Wiederholungen	Verdünnung	Proben
Periostin	Serum: **4,2%**	0,97	4	1 zu 100	33
	Plasma: **5,1 %**	0,887	4	1 zu 100	36
MUC 5 AC	Serum: **2,2 %**	0,999	6	1 zu 2	6
	Plasma: **15,9 %**	0,995	6	1 zu 2	6
MUC 5B	Serum: **9,6 %**	0,949	4	1 zu 2	36
	Plasma: **23,4 %**	0,986	4	1 zu 2	36
CCL 26 (MIP 4)	Serum: **12,5 %**	0,894	4	1 zu 2	33
	Plasma: **8,9 %**	0,902	4	1 zu 2	33
CPA 3	Serum: **9,8 %**	0,995	6	1 zu 2	6
	Plasma: **7,5 %**	0,943	6	1 zu 2	6
CLCA1	Serum: **17,8 %**	0,999	6	1 zu 2	6
	Plasma: **2,6 %**	0,998	6	1 zu 2	6
PAI II	EDTA: **5,4 %**	0,992	4	1 zu 2	20
	Heparin: **7,3 %**	0,988	4	1 zu 2	20
Osteopontin	Serum: **3,4 %**	0,998	4	1 zu 20	34
	Plasma: **9,1 %**	0,981	4	1 zu 20	36

Aus der Tabelle geht hervor, dass sich die überwiegende Anzahl der Variationskoeffizienten im mittleren einstelligen Prozentbereich befindet, die Tests also eine durchaus zufriedenstellende Messpräzision aufweisen. Für eine manuelle Methode sind dies in der Tat nicht unübliche und insofern befriedigende Werte, zumal es sich um eine relativ überschaubare Anzahl an Proben und Wiederholungen handelt. Lediglich die Präzision der Mucine im Plasma und des CLCA1 im Serum sind nicht zufriedenstellend, was diversen Ursachen geschuldet sein könnte. Hier wäre eine Reevaluation sinnvoll.

4.1.2.2 Methodenpräzision / Interassay

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten n Proben mit dem jeweiligen Protein gemessen und analog zum Intraassay die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag berechnet und gemittelt. (siehe Formel 3.5.3 und 3.5.4)

Tabelle 16 listet für das jeweilige Protein die mittleren VKs im Interassay für Serum und Plasma als auch die Anzahl der analysierten Proben, die Anzahl der jeweiligen Wiederholungen bzw. Tage sowie die eingesetzten Konzentrationen auf.

Tabelle 16: Präzision Inter-Assay

Biomarker	**Total imprecision [%]**		**Anzahl**		**n**
	Inter-Assay (VK)	**r**	**Wiederholungen**	**Verdünnung**	**Proben**
Periostin	Serum				
	Plasma				
MUC 5 AC	Serum: **28,5%**	0,795	3	1 zu 2	5
	Plasma				
MUC 5B	Serum				
	Plasma				
CCL 26 (MIP 4)	Serum: **16,9%**	0,92	2	1 zu 2	33
	Plasma:				
CPA 3	Serum: **13,3%**	0,792	3	1 zu 2	5
	Plasma: **14,8%**	0,846	2	1 zu 2	6
CLCA1	Serum: **29,1%**	0,998	3	1 zu 2	6
	Plasma: **33,8%**	0,998	2	1 zu 2	5
PAI II	EDTA: **25,4%**	0,964	2	1 zu 2	20
	Heparin: **14,6%**	0,982	2	1 zu 2	20
Osteopontin	Serum: **6,8%**	0,973	2	1 zu 20	32
	Plasma				

Im Vergleich zur vorausgegangenen Messpräzision stellt sich hier eine nicht ganz so überzeugende Methodenpräzision dar, die Variationskoeffizienten liegen im Durchschnitt zwischen 10 und 20 %, im Einzelfall auch darüber. Möglicherweise sind diese teilweise nicht ganz zufriedenstellenden Ergebnisse den nicht immer zu vermeidenden Auftauzyklen geschuldet.

4.1.3 Verdünnungslinearität

Eine native Probe wurde mit PBS verdünnt und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen bezüglich der jeweiligen Proteine analysiert. Es erfolgte die Berechnung der mittleren VKs nach Formel 3.5.3 als Maß für die Abweichung in niedrigeren Konzentrationen. Tabelle 17 veranschaulicht für die jeweiligen Proteine neben der Anzahl der gemessenen Proben und der Anzahl der Wiederholungen die verschiedenen Konzentrationen und die Abweichung der Messwerte als VK. Nach Durchführung einer Regressionsanalyse nach 3.5.7 und Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach 3.5.6 wurden Slope und Intercept bestimmt (3.5.8). Hierdurch wird das Maß an Übereinstimmung bzw. der Grad des Zusammenhangs der Messwerte in unterschiedlichen Verdünnungsstufen zum Ausdruck gebracht. Durch Steigung der Regressionsgeraden (idealerweise 1) und den Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse kann eine eventuelle Abweichung der Wertelage über einen gegebenen Konzentrationsbereich in zwei unterschiedlichen Verdünnungen (analog zu zwei unterschiedlichen Spezimen) beobachtet werden.

Tabelle 17: Verdünnungslinearität

Biomarker	Verdünnungslinearität				n	
	Slope	Intercept	r	VK	Proben	Verdünnungen
Periostin						1zu100; 1zu200; 1zu400
						1zu100; 1zu200; 1zu400
MUC 5 AC	0,849	0,015	0,999	5,60%	6	1zu2; 1zu4
	0,84	-0,08	0,995	18,80%	6	1zu2; 1zu4
MUC 5B						1zu2; 1zu5
						1zu2; 1zu5
CCL 26 (MIP 4)						1zu2; 1zu5
						1zu2; 1zu5
CPA 3	0,705	2,525	0,928	15,31%	6	1zu2; 1zu4
	1,248	-0,395	0,98	14,20%	6	1zu2; 1zu4
CLCA1	0,902	0,098	0,99	14,30%	6	1zu2; 1zu4
	0,885	0,011	0,991	3,10%	6	1zu2; 1zu4
PAI II						1 zu 2
						1 zu 2
Osteopontin	1,323	0	0,967	10,80%	20	1zu20; 1zu40
						1zu20; 1zu40

Die Übereinstimmung der Werte unterschiedlich verdünnter Proben stellt sich teilweise gut bis annehmbar dar, doch überschreiten die Variationskoeffizienten häufiger die Marke von 10%. Dieser Effekt mag einem zwischen den Messungen liegenden Auftauzyklus geschuldet sein.

4.1.4 Korrelation Serum und Plasma, Regressionsanalyse

Zur Vergleichbarkeit zwischen Serum und Plasma wurde eine Regressionsanalyse nach Formel 3.5.7 durchgeführt, daraus Slope und Intercept berechnet (3.5.8) und der Korrelationskoeffizient nach Pearson errechnet, wobei ein Wert von 1,0 absolut identischer Werte bedeuten würde (3.5.6).

Die folgende Tabelle listet für das jeweilige gemessene Protein neben der Anzahl der Proben den Korrelationskoeffizienten nach Pearson bezüglich der Korrelation zwischen Serum- und Plasmawerten auf sowie den Variationskoeffizienten bezüglich der Abweichung der Wertelage zwischen Serum und Plasma. Slope und Intercept geben Hinweise auf eine eventuell differierende Wertelage in den unterschiedlichen Spezimen.

Tabelle 18: Korrelation Serum und Plasma

	Anzahl Proben	r	VK	Slope	Intercept
Periostin	n = 33	0,892	0,08	0,646	679 ng/ml
MUC 5 AC	n = 6	0,742	0,46	1,376	0,101 ng/ml
MUC 5B	n = 33	0,975	0,143	0,993	-5,405 ng/ml
CCL 26 (MIP 4)	n = 31	0,909	0,128	0,927	-1,748 pg/ml
CPA 3	n = 12	0,947	0,228	0,969	0,003 ng/ml
CLCA 1	n = 12	0,998	0,227		
PAI II	n = 20	0,801	0,26	0,895	-0,063 ng/ml
Osteopontin	n = 32	0,898	0,304	1,484	10,342 pg/ml

Die Werte in den unterschiedlichen Spezimen unterscheiden sich, teilweise auch deutlich, so dass bei der Beurteilung von Messergebnissen stets das gleiche Spezimen verwendet werden sollte. Ein Unterschied, ob eines der untersuchten Medien grundsätzlich besser geeignet ist, lässt sich nicht erkennen.

Im Folgenden wurde eine Regressionsanalyse (3.5.7) durchgeführt und die ermittelten Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Absolut identische Werte in Serum und Plasma würden auf einer Geraden mit der Steigung 1 und dem y-Achsenabschnitt (0/0) zu liegen kommen. Der Schnittpunkt der tatsächlichen ermittelten Geraden mit der y-Achse gibt Auskunft über eine erhöhte bzw. erniedrigte Wertelage in einem der jeweiligen untersuchten Spezimen. Die Steigung gibt Hinweise über das Verhalten der Wertelage über einem bestimmten Mess- bzw. Konzentrationsbereich hinweg. Die Werte sind in Tabelle 18 abgebildet.

Es gilt die Formel: Y = slope * X + intercept, wobei y der Messwert aus dem Spezimen a und x der Messwert aus dem Spezimen b desselben Probanden ist.

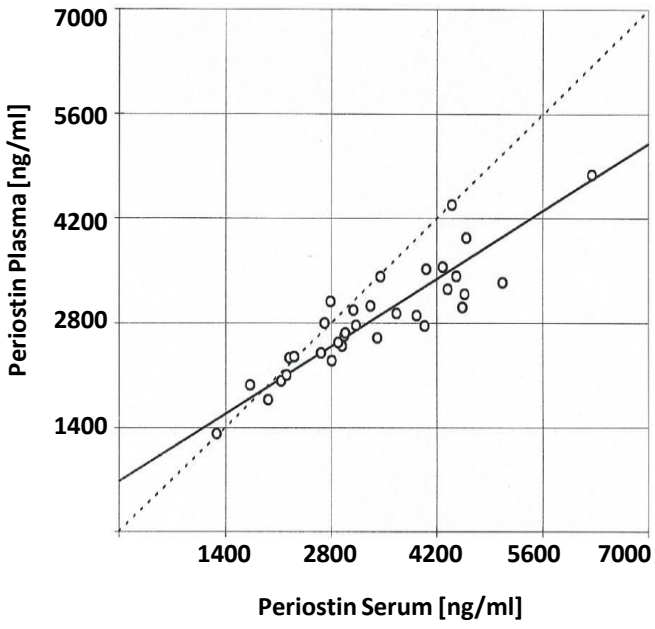


Abbildung 26: Periostin, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,892

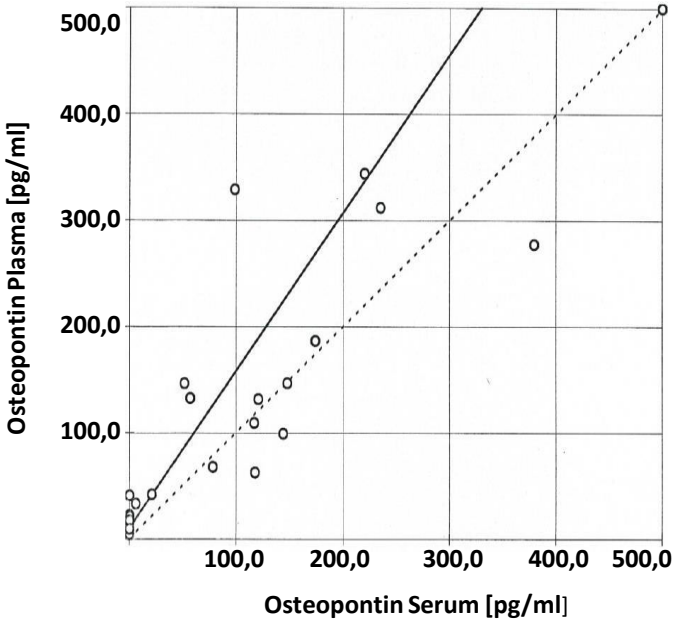


Abbildung 27: Osteopontin, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,898

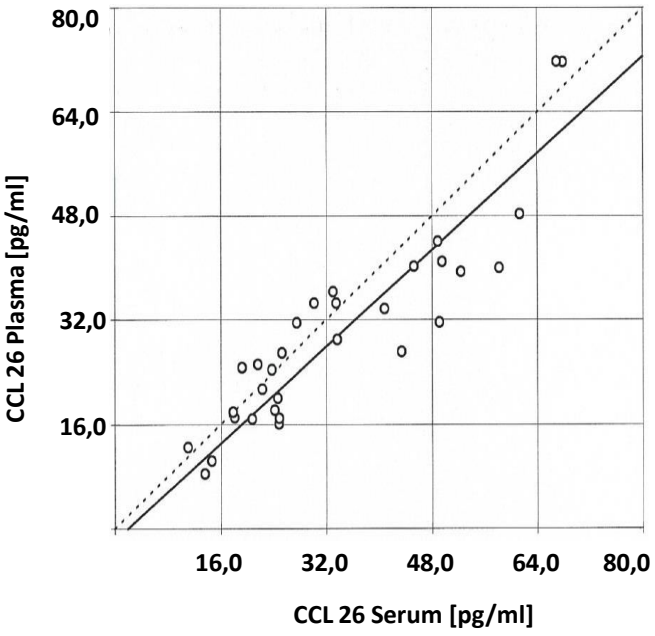


Abbildung 28: CCL 26, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,909

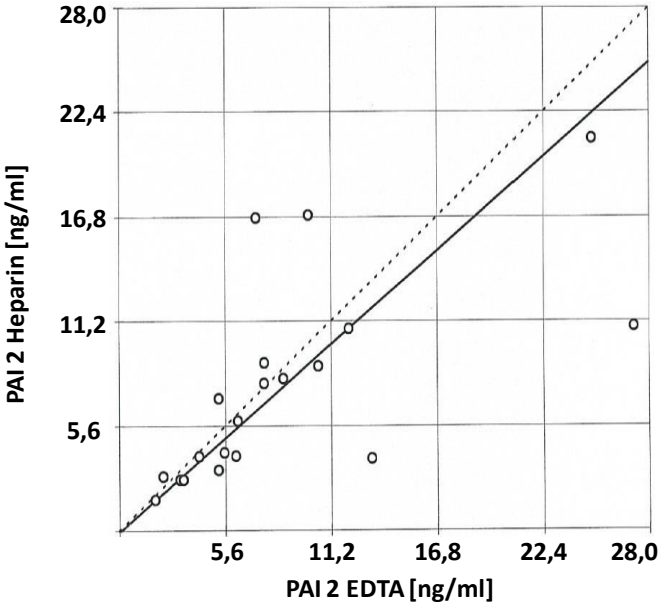


Abbildung 29: PAI 2, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,801

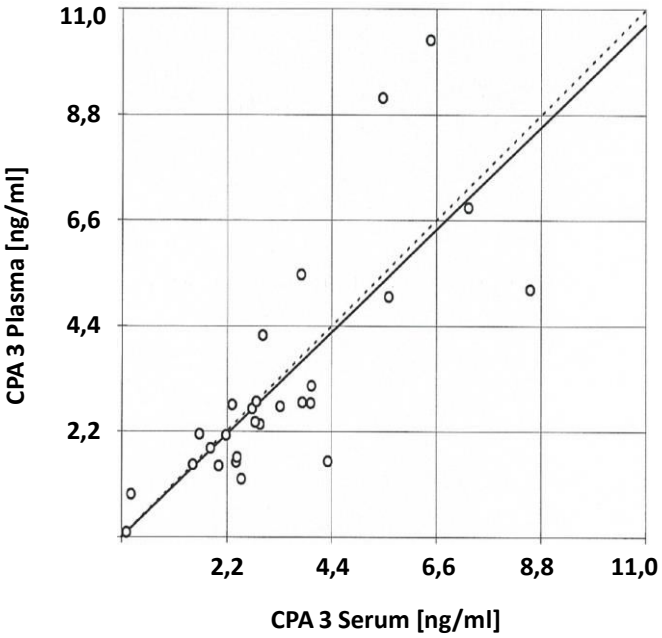


Abbildung 30: CPA 3, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,947

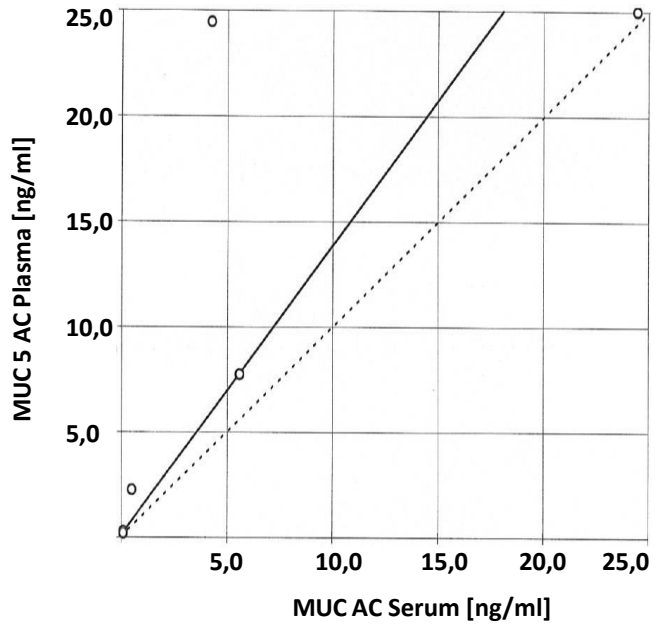


Abbildung 31: MUC 5 AC, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,742

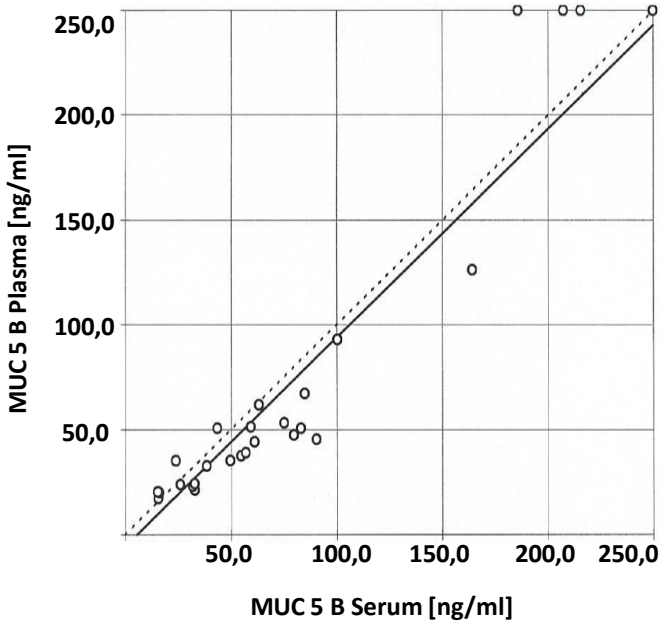


Abbildung 32: MUC 5 B, Darstellung der Wertepaare in Serum und Plasma mit Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient r = 0,975

Bei allen untersuchten Parametern finden sich mehr oder weniger große Abweichungen der Wertepaare hinsichtlich der Wertelage in den unterschiedlichen Spezimen. Periostin, Osteopontin und MUC 5AC zeigen eine nur mäßig Korrelation der Werte in unterschiedlichen Spezimen und die stärksten Abweichungen der Regressionsgeraden von der Steigung 1. Der Periostin-Assay misst im Plasma durchschnittlich etwas erniedrigte Werte, insbesondere bei höheren Konzentrationen des Analyten. Beim Osteopontin-Assay verhält es sich umgekehrt, hier werden die durchschnittlich höheren Konzentrationen im Plasma gemessen. Insbesondere in den höheren Wertelagen werden auch hier die größten Unterschiede gemessen.

Die übrigen Regressionsgeraden zeigen eine Steigung nahe 1, CCL 26 und MUC 5 B darüber hinaus eine leicht erniedrigte Wertelage im Plasma.

Insgesamt zeigt sich bei allen Assays eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den Messwerten in den unterschiedlichen Spezimen im niedrigeren und vor allem im mittleren Messbereich, größere Unterschiede treten tendenziell erst in höheren Bereichen auf.

Die Korrelation in den unterschiedlichen Spezimen ist im PAI 2-Assay und im MUC 5 AC-Assay eher schwach bis mäßig, im Periostin- und Osteopontin-Assay mäßig und in den übrigen Assays relativ stark.

Jedoch stellen sich die Unterschiede als VK oder als prozentuale Abweichung der Mediane oder Mittelwerte ausgedrückt im Falle des Periostin-Assay mit VK = 0,08 als verhältnismäßig gering und damit sehr gut dar.

4.2 Wertelage, Verteilung als Boxplots, Signifikanzunterschiede

Im Folgenden werden die Messergebnisse bezüglich des jeweiligen Parameters in Form von Boxplot-Diagrammen dargestellt - aufgeteilt in die jeweiligen Gruppen und differenziert nach Serum und Plasma.

Anhand von statistischen Hypothesentests wie t-Test (3.5.5) kann – wenn vorhanden - ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen (oder ggf. auch Spezimen) belegt werden. Mithilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) können entsprechend Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen durchgeführt werden (3.5.5). Die Signifikanz eines Unterschiedes wird auf einem definierten Signifikanzniveau durch den p-Wert (3.5.5) angegeben, der die Irrtumswahrscheinlichkeit ausdrückt, mit welcher das gegebene Ergebnis erhalten wird (t-Wert), falls in Wahrheit doch kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht, also die H_0-Hypothese wahr ist. Mithilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) können entsprechend Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen durchgeführt werden (3.5.5).

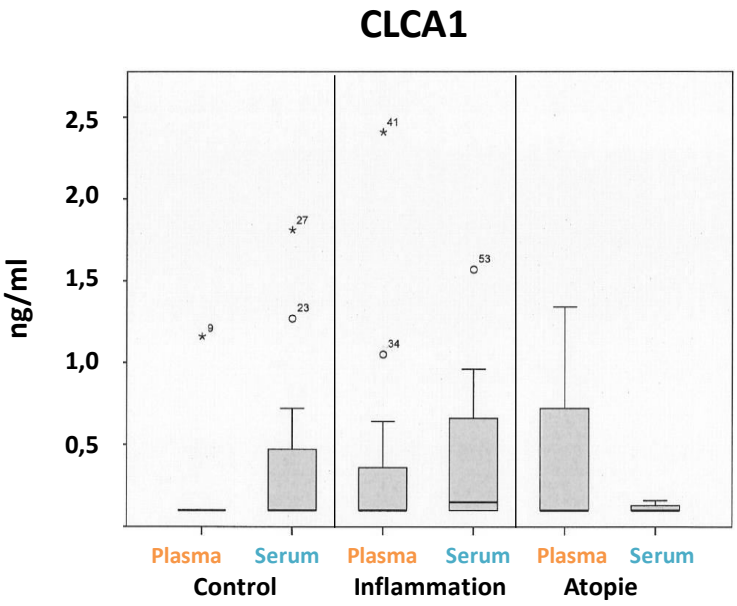


Abbildung 33: CLCA1 Boxplot-Diagramm, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum, dargestellt sind als Box ober- und unterhalb des Medians (schwarze Linie) das obere und untere Quartil (25 – 50% und 50 – 75%), welche zusammen 50% der Messwerte enthalten, als Antennen die äußeren Quartilen begrenzt durch die Extremwerte. Zusätzlich werden eventuelle Ausreißer dargestellt. p-Werte (auf dem 0,1-, 0,01- und 0,001-Niveau) sind nur bei statistischer Signifikanz angegeben.

Das Diagramm zeigt die Messwerte in den drei Untergruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils im Serum und im Plasma. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen lässt sich nicht feststellen. Die Mediane befinden sich im Bereich von LOD und LOQ, so dass lediglich von einem Hintergrundrauschen ausgegangen werden kann.

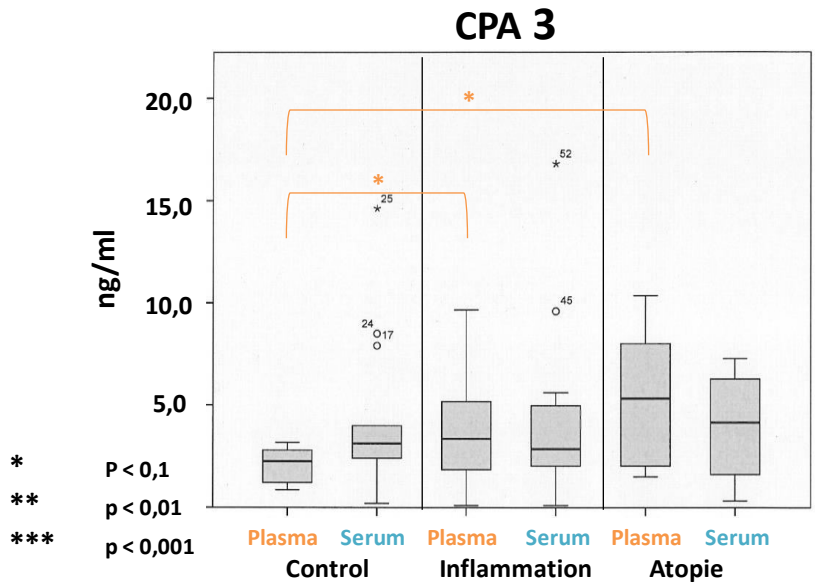


Abbildung 34: CPA 3 Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

Auf dem 0,01 Signifikanzniveau findet sich mit p = 0,08 zwischen der Kontrolle und der Gruppe der akuten Inflammation sowie mit p = 0,085 zwischen Kontrolle und Atopie noch kein signifikanter Unterschied, wohl aber auf dem Niveau von 0,1. Die Varianzanalyse (ANOVA) zeigt mit p = 0,011 einen Unterschied unter Berücksichtigung aller Gruppen. Die Unterschiede treten hier nur im Plasma zu Tage, nicht aber im Serum.

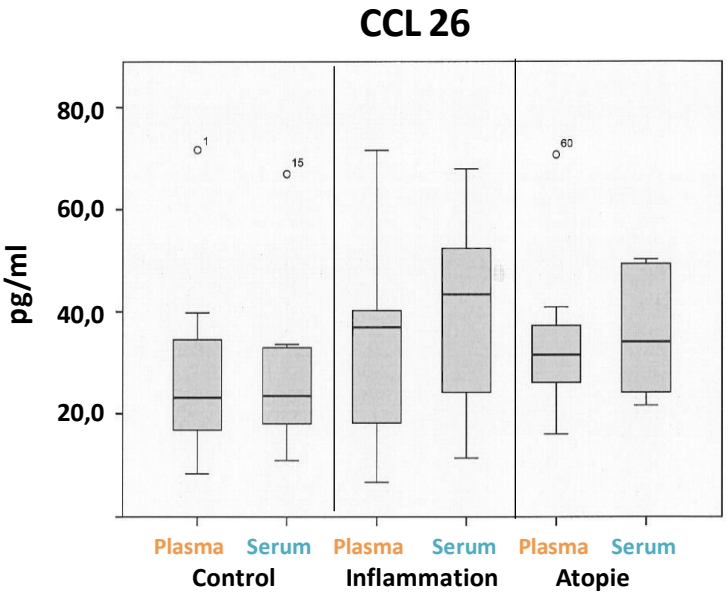


Abbildung 35: CCL 26 Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

Sowohl der Teilgruppenvergleich als auch die Varianzanalyse zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

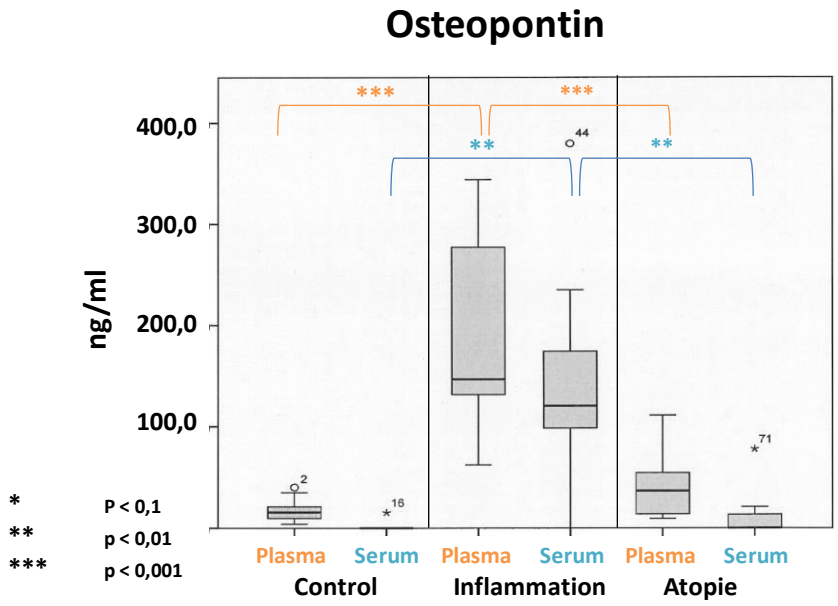


Abbildung 36: Osteopontin Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

Der Teilgruppenvergleich zwischen Kontrolle und akuter Inflammation weist sowohl im Plasma als auch im Serum einen hoch signifikanten Unterschied auf (Plasma: $p < 0,0001$, bzw. Serum $p = 0,001$), Auch der Unterschied zwischen akuter Inflammation und Atopie ist hoch signifikant: Plasma: $p < 0,0001$, Serum $p = 0,002$. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Atopie ist nicht feststellbar. Auch die Varianzanalyse aller drei Gruppen zeigt mit $p < 0,0001$ in Serum und Plasma Signifikanz auf dem Niveau 0,0005.

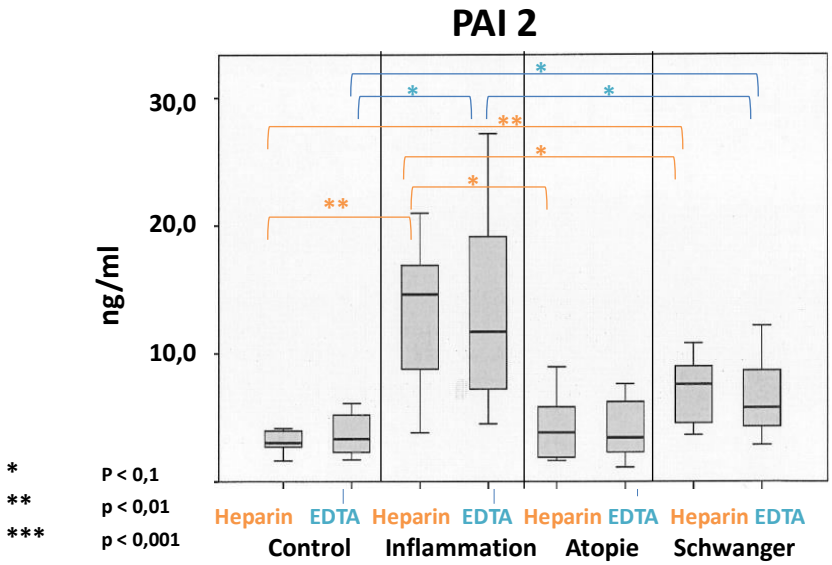


Abbildung 37: PAI 2 Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

Die Einzelgruppenanalyse im Heparinplasma ergibt folgende Ergebnisse: mit p = 0,003 ist der Unterschied auf dem 0,05-Niveau signifikant zwischen der Kontrollgruppe uns der Gruppe der akuten Inflammation, mit p = 0,003 ebenfalls signifikant zwischen der Kontrolle und den Schwangeren. Keine Signifikanz zeigt sich zwischen der Kontrolle und der Gruppe der Atopiker, (p = 0,353). Signifikant zeigt sich jedoch der Unterschied zwischen der akuten Inflammation und der Atopie mit p = 0,01. Der p-Wert zwischen der akuten Inflammation und der Gruppe der Schwangeren beträgt nur 0,099, ist aber somit noch auf dem Niveau von 0,1 signifikant. Die Varianzanalyse zwischen allen Gruppen liefert ein statistisch signifikantes Ergebnis: In allen untersuchten Spezimen liegt der p-Wert unter 0,0001. Die Einzelgruppenanalyse im EDTA-Plasma zeigt Signifikanz auf dem Niveau von 0,1 zwischen der Kontrollgruppe und der Inflammation (p = 0,015), der Kontrolle und der Gruppe der

Schwangeren (p = 0,079), sowie zwischen der Inflammation und der Atopie (p = 0,18). Keine Signifikanz jedoch findet sich zwischen Kontrolle und Atopie.

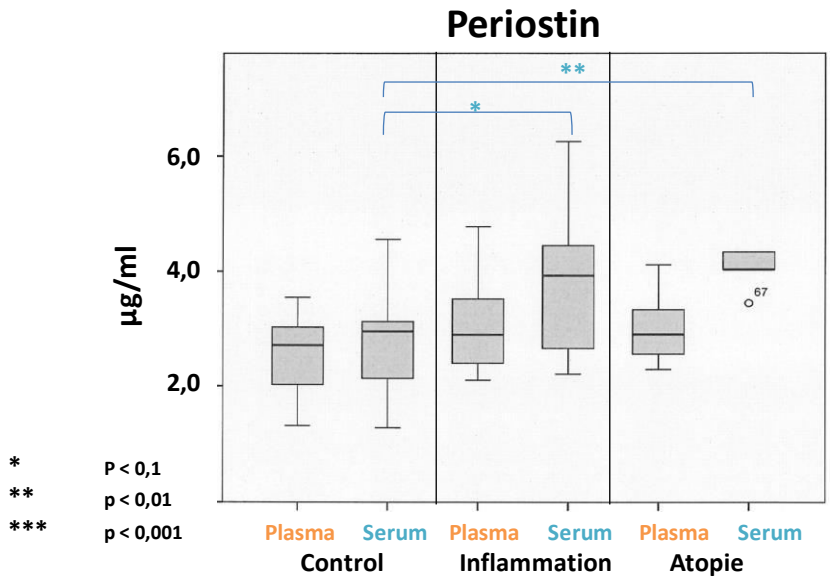


Abbildung 38: Periostin Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

In der Einzelgruppenanalyse ergibt sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Atopikern im Serum: p = 0,002, die Differenz der Mittelwerte ist hier auf dem Niveau 0,01 signifikant. Der Unterschied zwischen Kontrolle und akuter Inflammation ist es auf dem Niveau von 0,1 mit p = 0,083 signifikant. Darüber hinaus zeigt sich bei allen anderen Vergleichen keine statistische Signifikanz. Die Varianzanalyse im Serum ergibt: p = 0,025.

Zusammenfassend lässt sich also ein signifikanter Unterschied im Serum zwischen der Kontrolle auf der einen Seite sowie der Inflammation und der Atopie auf der anderen Seite konstatieren.

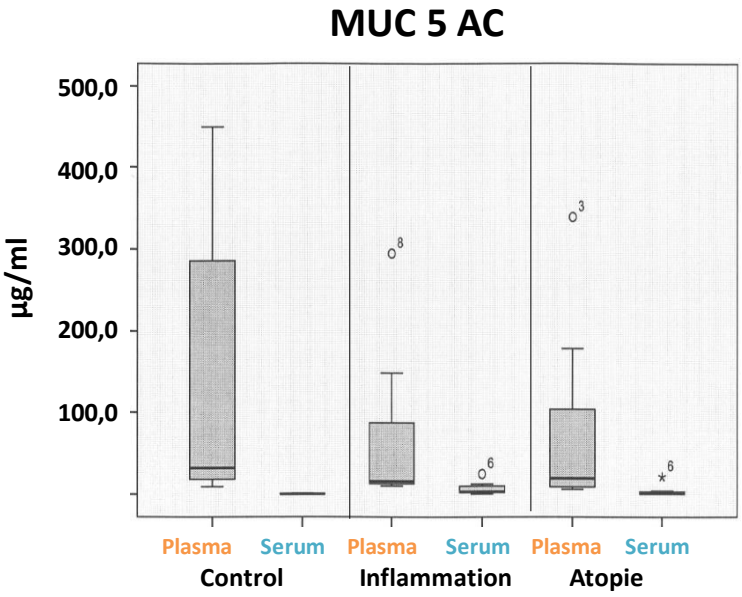


Abbildung 39: MUC 5 AC Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

Einerseits ist zu bemerken, dass der Test im Serum versagt, andererseits lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen messen.

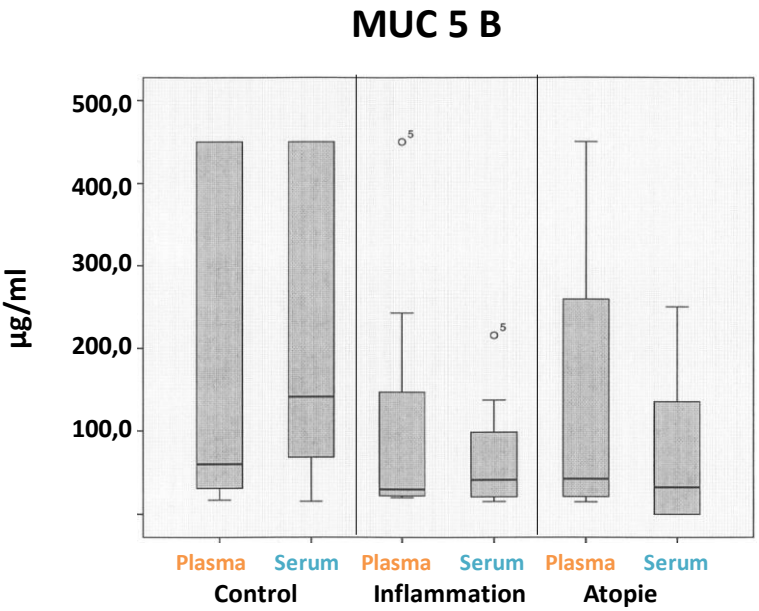


Abbildung 40: MUC 5 B Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie jeweils in Plasma und Serum; wie Abb. 33

Auf dem 5%-Signifikanzniveau ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

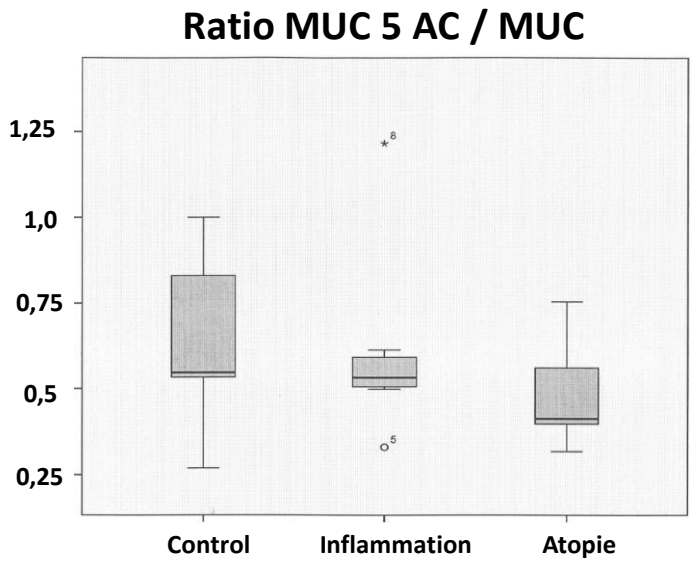


Abbildung 41: Ratio MUC 5 AC / MUC 5 B

Auch bei der Ratio ergeben sich auf dem 5%-Signifikanzniveau mit p = 0,5 keine Unterschiede.

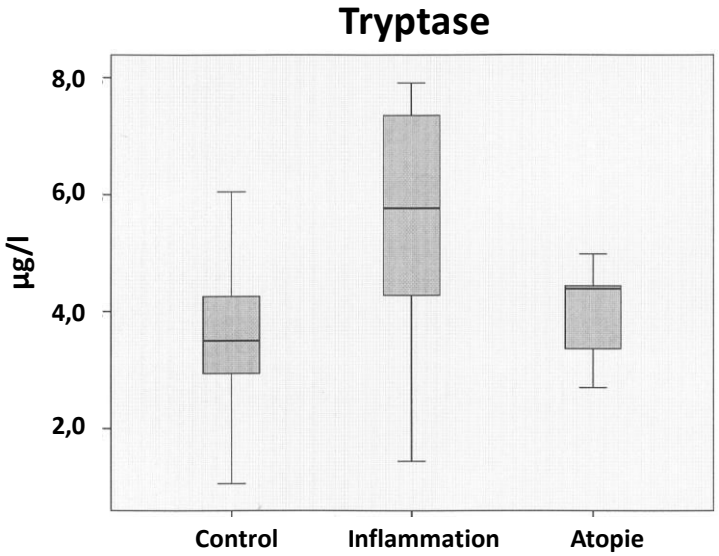


Abbildung 42: Tryptase Boxplot, Streuung der Werte in den drei Subgruppen Kontrolle, Inflammation und Atopie.

Hier zeigt sich mit p = 0,5 kein signifikanter Unterschied auf dem 5%-Niveau.

4.3 Synopsis der Leistungsdaten

Im Folgenden wird die Anzahl der in Doppelbestimmung gemessenen Proben sowie die Anzahl der unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen wiedergegeben sowie die daraus errechneten Testcharakteristika (Inter-/Intraassay: Korrelation r, Variationskoeffizient VK; Verdünnungslinearität und mittlere Abweichung bei unterschiedlicher Verdünnung).

Tabelle 19: Synopsis der Leistungsdaten 1

	Periostin	MUC 5 AC	MUC 5 B	CCL 26
Korrelation Serum - Plasma (r)	0,892	0,742	0,975	0,909
VK	0,08	0,46	0,143	0,128
	n = 33 Probenpaare	n = 6 Probenpaare	n = 33 Probenpaare	n = 31 Probenpaare
Interassay Serum		n = 5 Probenpaare, 3 Wiederholungen		n = 33 Probenpaare, 2 Wiederholungen
R		0,795		0,92
VC		0,285		0,169
Intraassay Serum	n = 33 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 6 Probenpaare, 6 Wiederholungen	n = 36 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 2 x 33 Probenpaare, 2 Wiederholungen
R	0,97	0,999	0,949	0,894
VC	0,042	0,022	0,096	0,125
Intraassay Plasma	n = 36 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 6 Probenpaare, 6 Wiederholungen	n = 36 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 33 Probenpaare, 2 Wiederholungen
R	0,887	0,995	0,986	0,902
VC	0,051	0,159	0,234	0,089
Verdünnungs-Linearität Serum		n = 6 Probenpaare, 3 Konzentrationen		
R		0,999		
Mittlere Abweichung bei höherer Verdünnung (%)		0,056		
Verdünnungs-Linearität Plasma		n = 6 Probenpaare, 2 Konzentrationen		
R		0,989		
Mittlere Abweichung bei höherer Verdünnung(%)		18,8		

Tabelle 20: Synopsis der Leistungsdaten 2

	CPA 3	CLCA 1	PAI 2	Osteopontin
Korrelation Serum - Plasma (r)	0,947	0,998	0,801	0,898
VK	0,228	0,227	0,26	0,304
	n = 12 Probenpaare	n = 12 Probenpaare	n = 20 Probenpaare	n = 32 Probenpaare
Interassay Serum	n = 5 Probenpaare, 3 Wiederholungen	n = 6 Probenpaare, 3 Wiederholungen	n = 20 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 32 Probenpaare, 2 Wiederholungen
R	0,792	0,998	0,964	0,973
VC	0,133	0,291	0,254	0,068
Interassay Plasma	n = 6 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 5 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 20 Probenpaare, 2 Wiederholungen	
R	0,846	0,998	0,982	
VC	0,148	0,338	0,146	
Intraassay Serum	n = 6 Probenpaare, 6 Wiederholungen	n = 6 Probenpaare, 6 Wiederholungen	n = 20 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 34 Probenpaare, 2 Wiederholungen
R	0,995	0,999	0,992	0,998
VC	0,098	0,178	0,054	0,034
Intraassay Plasma	n = 6 Probenpaare, 6 Wiederholungen	n = 6 Probenpaare, 6 Wiederholungen	n = 20 Probenpaare, 2 Wiederholungen	n = 36 Probenpaare, 2 Wiederholungen
R	0,943	0,998	0,988	0,981
VC	0,075	0,026	0,073	0,091
Verdünnungs-Linearität Serum	n = 6 Probenpaare, 3 Konzentrationen	n = 6 Probenpaare, 3 Konzentrationen		N = 20 Probenpaare, 2 Konzentrationen
R	0,95	0,998		0,967
Mittlere Abweichung bei höherer Verdünnung(%)	15,31	14,3		10,8
Verdünnungs-Linearität Plasma	n = 6 Probenpaare, 3 Konzentrationen	n = 6 Probenpaare, 3 Wiederholungen		
R	0,926	0,993		
Mittlere Abweichung bei höherer Verdünnung(%)	14,2	3,1		

4.4 Zusammenfassung der Testcharakteristika

In der im Folgenden dargestellten Zusammenfassung werden die ermittelten und errechneten Leistungsdaten der analytischen Sensitivität (LOD und LOQ), der Intra- und Interassays sowie der Verdünnungslinearität synoptisch dargestellt.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Leistungsdaten

Biomarker	Analytical sensitivity		Within run-imprecision [%]		Total imprecision [%]		Dilution linearity			
	LOD	LOQ	Intra-Assay (VK)	r	Inter-Assay (VK)	r	slope	intercept	r	VK
Periostin	1,5 ng/ml	3,9 ng/ml	Serum: 4,2%	0,97						
			Plasma: 5,1 %	0,887						
MUC 5 AC	1,04 ng/ml	2,66 ng/ml	Serum: 2,2 %	0,999	28,50%	0,795	0,849	0,015	0,999	5,60%
			Plasma: 15,9 %	0,995			0,84	-0,08	0,995	18,80%
MUC 5B	2,9 ng/ml	7,6 ng/ml	Serum: 9,6 %	0,949						
			Plasma: 23,4 %	0,986						
CCL 26 (MIP 4)	0,2 pg/ml	0,65 pg/ml	Serum: 12,5 %	0,894	16,90%	0,92				
			Plasma: 8,9 %	0,902						
CPA 3	1,19 ng/ml	3,26 ng/ml	Serum: 9,8 %	0,995	13,30%	0,792	0,705	2,525	0,928	15,31%
			Plasma: 7,5 %	0,943	14,80%	0,846	1,248	-0,395	0,98	14,20%
CLCA1	0,61 ng/ml	1,55 ng/ml	Serum: 17,8 %	0,999	29,10%	0,998	0,902	0,098	0,99	14,30%
			Plasma: 2,6 %	0,998	33,80%	0,998	0,885	0,011	0,991	3,10%
PAI II	1,05 ng/ml	2,66 ng/ml	EDTA: 5,4 %	0,992	25,40%	0,964				
			Heparin: 7,3 %	0,988	14,60%	0,982				
Osteopontin	381 pg/ml	985 pg/ml	Serum: 3,4 %	0,998	6,80%	0,973	1,323	0	0,967	10,80%
			Plasma: 9,1 %	0,981						

5. Diskussion

5.1 Diskussion der einzelnen Biomarker

Im Folgenden sollen die Messwerte zunächst im Hinblick auf die allgemeine Wertelage beurteilt werden. Weiterhin erfolgt eine Beurteilung im Hinblick auf mögliche Unterschiede zwischen Serum und Plasma und insbesondere auf Unterschiede in den drei Gruppen Kontrolle, akute Inflammation und Atopie. Des Weiteren sollen die Tests in Bezug auf ihre spezifischen Leistungsdaten hin beurteilt werden.

Lassen sich aufgrund dieser Betrachtungen Rückschlüsse auf das jeweilige Protein ziehen oder bestätigen die Messergebnisse Bekanntes bezüglich der Verteilung, Struktur und Funktion der Proteine bzw. fügen sie sich ins Bild des bereits Bekannten?

Darüber hinaus soll eine Beurteilung bezüglich der Eignung als potentieller Biomarker abgegeben werden. Dieses soll von der Rationalen her erfolgen und zwar basierend auf den eingangs diskutierten Erkenntnissen zu den jeweiligen Proteinen und auf Grundlage der zitierten Studien und Erkenntnissen aus der Grundlagenwissenschaft.

5.1.1 CLCA1

Zunächst fällt beim CLCA1 auf, dass die Mediane der Messwerte in allen drei Gruppen sich nahe des Probenleerwertes befinden. Das Limit of Detection liegt errechnet bei 0,61 ng/ml, dieses wird von einem Großteil der Messwerte gar nicht erreicht, das Limit of Quantification von 1,55 ng/ml wird nur von wenigen Ausreißern erreicht. Aufgrund dieser extrem niedrigen Wertelage muss doch eher von einem Hintergrundrauschen ausgegangen werden, signifikante Unterschiede in den drei Gruppen oder Unterschiede im Serum und Plasma lassen sich so nicht nachweisen. Die Differenz der Mittelwerte in den

unterschiedlichen Gruppen ist auf dem Niveau von 0,05 nicht signifikant. Offensichtlich ist der Test nicht geeignet zur Quantifizierung von CLCA1 im Blut oder aber – und das könnte im Hinblick auf die Lokalisation und Funktion des Proteins die wahrscheinlichere Erklärung sein – es gibt im peripheren Blut überhaupt keine quantitativ detektierbaren Mengen an CLCA1. CLCA1 ist vermutlich ein zellmembranassoziiertes Protein, welches in die Regulation Ca^{2+}-abhängiger-Cl^{-}-Kanäle involviert ist und so unter anderem durch den transmembranösen Chloridstrom in die Produktion, Menge und vor allem die Beschaffenheit von Mucus eingreifen kann. Darüber hinaus hat es steuernde Eigenschaften die *MUC*-Genexpression betreffend. Hieraus wird ersichtlich, dass CLCA1 als membranständiges oder lokal im Interzellularraum des respiratorischen Epithels lokalisiertes Protein nicht systemisch detektierbar ist und somit die Werte unterhalb des LOD nicht zwingend auf einem Testversagen beruhen. Vielmehr scheint CLCA1 per se nicht als systemischer, peripher zu messender Biomarker geeignet zu sein. Fraglich wäre, ob in einem vorselektionierten Kollektiv von TH2-Endotypen eine Menge oberhalb des LOQ auch in der Peripherie detektierbar und quantifizierbar wäre, was aus den aktuellen Messwerten nicht herzuleiten ist. Eine Erprobung an einem vorselektierten Kollektiv von TH2-Endotypen müsste diese Frage beantworten. Plausibel erscheint jedoch, dass ein zellmembranassoziiertes Protein bzw. ein Protein der extrazellulären Matrix des (respiratorischen) Epithels nicht unbedingt geeignet für eine Bestimmung im peripheren Blut ist.

5.1.2 Carboxypeptidase A3

Die Mediane der Messwerte überschreiten alle deutlich das Limit of Detection und insbesondere in der Gruppe der Atopiker liegen die Messwerte deutlich über dem Limit of Quantification, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei nicht um ein Hintergrundrauschen handelt. Signifikante

Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen finden sich nicht, jedoch ein Trend zu einer leicht erhöhten Wertelage von der Kontrollgruppe ausgehend über die Gruppe der akuten Inflammation bis hin zu der Gruppe der Atopiker mit der höchsten Wertelage (Trend). Zwischen Kontrolle und akuter Inflammation findet sich auf dem 0,05-Niveau mit p = 0,08 und zwischen Kontrolle und Atopie mit p = 0,085 noch keine Signifikanz. Mit einer Unpräzision von kleiner 10% im Intraassay und kleiner 14% im Interassay liefert der Test befriedigende Leistungsdaten für eine manuelle Methode, die Korrelation zwischen Serum und Plasma ist mit r = 0,95 halbwegs annehmbar, jedoch optimierungsbedürftig. In der Verdünnungslinearität zeigt sich mit 15% eine gerade noch akzeptable mittlere Abweichung. Alles in allem scheint Carboxypeptidase A3 also im peripheren Blut anwesend zu sein, und der Test brauchbar, um diese zu detektieren und zu quantifizieren. Ob CPA3 geeignet ist, eine signifikante Unterscheidung zwischen den TH2-Signaturen zu treffen, setzt die Untersuchung an vorselektionierten TH2-Endotypen voraus. Carboxypeptidase A3 ist ein von Mastzellen sezerniertes Enzym mit der Funktion einer Exopeptidase, welche unter anderem im Atemwegsepithel von Asthmatikern zusammen mit Endopeptidasen wie Tryptasen oder Chymase von Mastzellen verstärkt sezerniert wird. Hier stellt sich die Frage, ob die gemessene Carboxypeptidase A3 auch die initial im bronchialen Epithel lokalisierte ist und nun systemisch, peripher detektierbar wird, oder ob sie von Mastzellen anderer Lokalisation stammt.

5.1.3 CCL26 (MIP4)

Die Messwerte des CCL26 heben sich alle deutlich vom LOD und LOQ ab, das Protein scheint also grundsätzlich im peripheren Blut vorhanden und quantifizierbar zu sein. Bezüglich der Wertelage findet sich in der Kontrollgruppe ein Median von ca. 20 pg/ml, die höchste Wertelage mit einem

Median von ca. 40 pg/ml findet sich in der Gruppe der akuten Inflammation, die Gruppe der Atopiker nimmt mit ca. 30 pg/ml eine mittlere Stellung ein. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den untersuchten Gruppen lässt sich jedoch nicht feststellen, insofern bleiben die Differenzen in den Gruppen ein Trend. Bezüglich der Unpräzision zeigt der Test eine VK von 8,9% bzw. 12,5% im Intraassay und somit noch akzeptable Leistungsdaten und 16,9 % im Interassay, was für eine manuelle Methode gerade noch hinnehmbar scheint und durch Routine optimierbar ist. Im Serum jedoch wird eine leicht erniedrigte Wertelage gemessen. CCL 26 scheint nicht nur im TH2-Endotypen eine Rolle zu spielen, sondern auch in der akuten Inflammation im Allgemeinen. Insofern gilt auch hier, dass zur Überprüfung der Signifikanz der CCL26-Konzentrationen in TH2-hoch-Individuen gegenüber TH2-niedrig-Individuen vorselektionierte TH2-hoch und –niedrig Kollektive bzw. TH2-Endotypen und non-TH2-Endotypen verglichen werden müssten. Da CCL26 offensichtlich allgemein im Entzündungsgeschehen angetroffen werden kann (die höchsten Konzentrationen werden in der Gruppe der akuten Inflammation gemessen), ist fraglich ob es sich als Biomarker für einen speziellen Asthma-Endotypen eignen wird oder aufgrund seiner in Kapitel 1.8.4 dargelegten komplexen Interaktionen nicht zu vage und zu allgemein in der Interpretierbarkeit bleibt, also eher ein allgemeinerer Entzündungsmarker ist.

5.1.4 Osteopontin

Am deutlichsten von allen untersuchten potentiellen Biomarkern differieren in den drei Subgruppen die Osteopontinkonzentrationen. Alle liegen deutlich oberhalb des errechneten LOQ von ca. 1 ng/ml, jedoch ist die signifikant höchste Wertelage in der Gruppe der akuten Inflammation anzutreffen. Hier werden im Median Konzentrationen von ca. 150 ng/ml angetroffen. Insgesamt erscheint die Wertelage im Serum niedriger, auch die Korrelation zwischen

Serum und Plasma ist mit r = 0,898 nicht gut. Die niedrigsten Werte insgesamt werden in der Gruppe der gesunden Kontrollen angetroffen. Die Differenz der Mittelwerte der Gruppen Kontrolle und akute Inflammation ist auf dem Niveau 0,05 mit $p < 0,0001$ signifikant, ebenso ist der Unterschied zwischen der akuten Inflammation und der Gruppe der Atopiker mit $p < 0,0001$ signifikant. Lediglich im Vergleich zwischen Kontrolle und Atopie findet sich keine Signifikanz. Die Leistungsdaten bezüglich der Unpräzision stellen sich mit VKs von 3,4% bzw. 9,1% im Intraassay und mit 6,8% im Interassay sehr gut dar. Kritisch zu hinterfragen ist jedoch die Funktion des Osteopontin im Entzündungsgeschehen und somit seine Eignung als potentieller Biomarker. Unbestritten ist es im Rahmen einer akuten Inflammation deutlich erhöht anzutreffen, doch wie oben beschrieben ist die Rolle des Osteopontin offensichtlich sehr komplex und schlecht verstanden. Einerseits erfüllt es eine Funktion in der Entwicklung von TH1-Entzündungen, andererseits scheint es Hinweise darauf zu geben, dass es TH2-Antworten zu unterdrücken vermag und umgekehrt durch TH2-Zytokine wie IL-13 seinerseits inhibiert werden kann. Weiterhin scheint der Zeitpunkt von Bedeutung zu sein, zu welchem das Osteopontin betrachtet wird: in der frühen Phase der Allergenexposition oder zu späteren Zeitpunkten im Krankheitsverlauf wie beispielsweise der wiederholten Allergenchallenge oder auch der Chronifizierung und letztendlich in Prozessen das Remodeling betreffend. Insofern scheint die Rolle noch zu schlecht verstanden zu sein, um diesen Marker einfach zu interpretieren, auch wenn er durchaus zufriedenstellend messbar ist. Eine dichotome Entscheidung bezüglich des TH2-Endotyps scheint anhand eines Osteopontinlevels nicht einfach abzuleiten zu sein.

5.1.5 Serpin B2

Die Wertelage des PAI 2 liegt in der Kontrollgruppe sowie der Gruppe der Atopiker im unteren Quartil knapp über LOD und LOQ. Deutlicher heben sich die

Messwerte im Median bei Schwangeren ab, jedoch die höchste Wertelage erreicht nur die Gruppe der akuten Inflammation mit einem Median von 12 bzw. 15 ng/ml. Statistisch signifikante Unterschiede bestehen zwischen allen Gruppen: Auf dem 0,05-Niveau ergibt sich zwischen Kontrolle und akuter Inflammation: p = 0,003; zwischen Kontrolle und Schwangeren p = 0,003; zwischen Inflammation und Atopie p = 0,01 und zwischen Inflammation und Schwangeren p = 0,09. Eine Ausnahme bildet mit p = 0,353 der Vergleich zwischen Kontrolle und Atopie, hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Die Unpräzision im Intraassay ist mit einer VK von 5,4% im EDTA-Plasma und 7,3% im Heparin ausreichend gut, die Korrelation zwischen EDTA und Heparin-Plasma mit r = 0,8 jedoch nur sehr mäßig. Auch die Unpräzision im Interassay ist mit einer VK von 20% im Mittel nicht ausreichend. Da sich in der Gruppe der akuten Inflammation eine signifikant höhere Menge an PAI 2 detektieren lässt als in der Gruppe der Atopiker, ist fraglich ob sich PAI 2 als systemischer Biomarker für einen TH2-Endotyp eignet. Analog zum CCL 26 wäre zu überprüfen, ob sich statistisch signifikante Unterschiede in einem vorselektionierten TH2-hoch-Kollektiv, also TH2-Endotypen sowohl gegenüber einer Gruppe der allgemeinen akuten Inflammation als auch einem vorselektionierten non-TH2-Endotyp-Kollektiv finden lassen. Möglicherweise spielt in der TH2-Entzündungsantwort bzw. bei der Entstehung des TH2-Endotyps die intrazelluläre, nicht sezernierte und somit nicht systemisch messbare Fraktion des 47 kDA PAI 2 die treibende Kraft, während die sezernierte 60 kDA Form, welche hier systemisch detektiert wurde, eher ein allgemeiner Marker für akute Inflammation ist, und über die Art und Weise der T-Zell Aktivierung möglicherweise jedoch gar nichts auszusagen vermag.

Generell stellt sich bei dieser Betrachtungsweise die Frage, in welcher der hier abgebildeten Messgruppen sich die TH2-hoch-Population bzw. der TH2-Endotyp wiederfinden würde. Eher in der Gruppe der akuten Inflammation oder in der Gruppe der Atopiker? Vor diesem Hintergrund jedoch könnte durchaus sowohl

CCL 26 als auch PAI2 noch ein brauchbarer Biomarker sein, wenn man betrachtet, dass CCL 26 und vor allem PAI2 hier die größte Spannbereite als auch den höchsten Median in der Gruppe akute Inflammation aufweist.

Diese Frage kann nur durch erneute Messung zytologisch oder molekularbiologisch vorselektionierter Kollektive von TH2-Endotypen, non-TH2-Endotypen (TH2-niedrig-Asthmatiker), gesunder Kontrollen und Patienten mit akuter Inflammation anderer Ursache und die folgende Untersuchung der Differenz der Mittelwerte im Hinblick auf statistische Signifikanz beantwortet werden.

5.1.6 MUC 5AC und 5B

MUC5AC: Hier ist in allen Gruppen im Median eine relativ niedrige Wertelage zu beobachten, jedoch über LOD und LOQ (1,04 ng/ml bzw. 2,66 ng/ml) erhaben. Grundsätzlich versagt der Test hier in Bezug auf das Untersuchungsmaterial Serum. In den oberen beiden Quartilen werden insbesondere in der gesunden Kontrollgruppe sehr hohe Werte erreicht. Bei einem Median von 40 ng/ml werden Werte über 400 ng/ml und darüber hinaus erreicht. Inflammation und Atopie unterscheiden sich nicht. Die Differenz der Mittelwerte aller untersuchen Gruppen ist auf dem Niveau 0,05 nicht signifikant. In Bezug auf die Unpräzision zeigt der Test im Intraassay mit einer VK von 15 % einen noch hinnehmbaren, jedoch optimierbaren Wert.

MUC5B: Hier zeigt sich bezüglich der Wertelage eine ähnliche Verteilung wie bei MUC5AC: Eine über das Hintergrundrauschen deutlich erhabene Verteilung der Messwerte mit den höchsten Konzentrationen in der gesunden Kontrollgruppe. Im Unterschied jedoch werden hier auch Konzentrationen im Serum gemessen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen auf dem 0,05-Niveau lässt sich nicht feststellen. Mit VKs im Serum von 9,6 % und 23,4% zeigt

sich eine durchwachsene Leistung bezüglich Unpräzision. Die Werte in Serum und Plasma korrelieren mit r = 0,975.

Da wie oben beschrieben MUC5AC bei TH2-Endotypen heraufreguliert zu sein scheint, und MUC5B eher eine Clearancefunktion in den kleinen Atemwegen zugeschrieben wird, müsste - wie auch auf genetischer Ebene bei TH2-hoch-Individuen beobachtet und nachgewiesen wurde - die Ratio zugunsten des MUC5AC verschoben sein. Anhand der hier gemessenen Daten lässt sich in keiner Gruppe eine signifikant erhöhte Ratio nachweisen, auch hier bleibt das Problem, dass diese Untersuchung an zytologisch oder molekularbiologisch vorselektionierten Probanden erfolgen muss. Möglicherweise sind auch die Leistungsdaten des eingesetzten Tests zu schlecht. Die gleichen Proben wurden auch im Hinblick auf ihre Konzentration an Tryptase gemessen, wo sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration in der Gruppe der akuten Inflammation bestätigt. Eine Abgrenzung zwischen TH2-Endotyp (TH2-hoch) und non-TH2-Endotyp (TH2-niedrig) hat hier wie bislang bei allen potentiellen Biomarkern noch zu erfolgen.

5.1.7 Periostin

Die Wertelage bezüglich des Periostin unterscheidet sich in den untersuchten Gruppen nur unwesentlich, im Serum werden tendenziell höhere Werte gemessen, hier scheint der Test möglicherweise sensitiver zu sein. Kritisch stellt sich dar, dass im Median kaum das LOQ überschritten wird, lediglich in der Gruppe der akuten Inflammation (und in der Gruppe der Atopie gemessen im Serum) liegen die oberen zweieinhalb Quartilen über dem Limit of Quantification. Im direkten Vergleich zwischen Kontrolle und Atopie gemessen im Serum lässt sich mit p = 0,002 ein signifikanter Unterschied nachweisen, der Unterschied zwischen Kontrolle und akuter Inflammation ist mit p = 0,083 auf

dem 0,05-Niveau nicht signifikant, wohl aber auf dem Niveau 0,1 (ebenfalls gemessen im Serum).

Mit VKs von 4,2 % und 5,1 % im Intraassay werden jedoch sehr gute Leistungsdaten bezüglich Unpräzision erzielt. Die Korrelation zwischen Serum und Plasma beträgt jedoch nur r = 0,892. Insgesamt zeigt der Test die bessere Sensitivität im Serum.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass es bei einer alles in allem befriedigenden Leistunsperformance des Tests nicht das Ziel ist, signifikante Unterschiede bezüglich der peripheren Periostinkonzentrationen zwischen Gruppen von Probanden mit akuter Inflammation im Allgemeinen gegenüber Gesunden oder Atopikern nachzuweisen, sondern als idealer Biomarker soll sich die Periostinkonzentration in der Subgruppe der Individuen des TH2-Endotyps signifikant gegenüber allen anderen – ganz gleich ob gesund, TH2-niedrig-Asthma oder einer Inflammation basierend auf sonstigen Ursachen – abgrenzen. Der signifikante Unterschied soll bestehen zwischen Periostin-Konzentration von TH2-Endotypen (molekularen TH2-hoch-Phänotypen) gegenüber allen anderen Individuen. Dieser Nachweis wäre noch zu erbringen. Zur Rolle des Periostin als Biomarker siehe die ausführlichere Diskussion weiter unten.

5.2 Zusammenfassende Wertung und Beurteilung der Testcharakteristika:

Da die gemessene Anzahl der Probanden zum einen als auch die Anzahl der Wiederholungsmessungen zum anderen (sowohl im Intra- und Interassay als auch nur orientierend betrachtet für die Bestimmung der Verdünnungslinearitäten) doch eher als gering einzuschätzen ist, könnte erwartet werden, dass bei größerem Probenumfang und gesteigerter Wiederholungsanzahl möglicherweise bessere Ergebnisse die Qualitätskriterien betreffen zu erwarten sind. Nicht zuletzt da sich Ausreißer relativieren und sich

die Wahrscheinlichkeit von möglichen Interferenzen relativiert, wenn sich die Tests auf eine größere Stichprobenmenge in der Grundgesamtheit beziehen. Hier besteht Erweiterungs- und Ergänzungsbedarf.

Zum anderen ist wie bei der Betrachtung der einzelnen Biomarker schon angedeutet wurde zu beachten: Um eine signifikante Unterscheidung zwischen einer TH2-hoch und einer TH2-niedrig-Gruppe bzw. einer Gruppe von Atopikern oder anderweitig chronisch Kranken zu erlauben, bedarf es zunächst einer mithilfe molekularbiologischer Methoden vordefinierten Gruppe von Individuen des TH2-Endotyps. Die Serum- oder Plasmaproben dieser Individuen können dann in der Folge anhand der evaluierten ELISA-Tests in Bezug auf die jeweiligen Proteine getestet werden. Ebenso zu verfahren wäre mit einer Gruppe vordefinierter Non-TH2-Endotypen, diese dann idealerweise aufgeschlüsselt in Atopiker, Gesunde, Personen mit einer akuten Inflammation und evtl. weiteren.

Die so gewonnenen Messergebnisse müssten einem t-Test bzw. einer Varianzanalyse unterzogen werden, um vorherzusagen, ob zum einen das jeweilige Plasma-Protein überhaupt in der Lage ist als Biomarker eine Diskriminierung zwischen den untersuchten Gruppen TH2-Endotyp und allen anderen zu ermöglichen und zum anderen ob der evaluierte ELISA-Test in der Lage ist einen signifikanten Unterschied in den betrachteten Gruppen zu messen und so eine Vorhersage und eine Zuordnung zu dem entsprechende Endotypen zu ermöglichen.

Insofern bedarf es also Proben von molekularbiologisch vordefinierten TH2-Endotypen – also von Proben von TH2-Endotypen, welche über PCR-bestätigte Heraufregulation typischer TH2-Gene im bronchialen Epithel vordefiniert wurden. Hieran müsste untersucht werden, ob die Level der potentiellen Biomarker im Plasma oder Serum einen signifikanten Unterschied aufweisen, der eine Zuordnung zu einem der beiden TH2-hoch oder TH2-niedrig-Typen ermöglicht.

5.3 Periostin als Biomarker der TH2-Inflammation

Vor diesem Hintergrund und dem Hintergrund der einleitend beschriebenen Studien wurde kürzlich die Rolle des Periostin als potentieller systemischer Biomarker eingehender untersucht (77).

Wie eingangs dargelegt, zeigt sich die eosinophile Atemwegsinflammation heterogen in Asthmapatienten. Wie ebenfalls einleitend erläutert, können unterschiedliche molekulare Phänotypen des Asthma differenziert werden und zwar anhand des Expressionslevels von Genen induzierbar durch TH2-Zytokine – nämlich ein TH2-hoch-Phänotyp sowie ein TH2-niedrig-Phänotyp bzw. TH2-Endotypen und Non-TH2-Endotypen. Diese Gensignatur, welche unter anderem auch Periostin enthält, ist in etwa der Hälfte aller Asthmapatienten nachweisbar und ist deutlich assoziiert mit einer eosinophilen Atemwegsentzündung (siehe oben).

Der Umstand, dass die Identifikation dieses Subtyps bislang von invasiven sowie molekularbiologischen Methoden abhing, macht die Etablierung eines nicht-invasiven, systemischen, kostengünstig zu messenden Biomarkers notwendig.

Die Erkenntnisse der anfangs zitierten Studien zusammenfassend lässt sich folgendes zu Periostin, seiner Induzierbarkeit und seiner Wirkungen subsumieren:

IL-13 ist ein pleiotrophes, durch aktivierte T-Zellen, natürliche Killerzellen, Basophile, Eosinophile, Mastzellen und andere immunkompetente Zellen produziertes TH2-Zytokin, welches stark eingebunden ist in die Pathogenese des (atopischen) Asthma bronchiale. Erhöhte IL-13-Level wurden in den Atemwegen von Asthmapatienten nachgewiesen, jedoch konnten diese erhöhten Werte nur bei einem Teil der Patienten gefunden werden.

Es konnte durch systematische Analyse der Genexpression (Gene Expression Profiling) gezeigt werden, dass die drei am stärksten unterschiedlich

exprimierten Gene im bronchialen Epithel von Asthmapatienten und gesunden Kontrollen Periostin (*POSTN*), chloride-channel accessory protein 1 (*CLCA1*) und PAI 2 (*SERPINB2*) sind. Die Expression dieser Gene ist sensitiv gegenüber einer Behandlung mit inhalativen Cortikosteroiden im Sinne einer Unterdrückung. Alle drei Gene lassen sich in vitro in bronchialen Epithelzellen durch Interleukin-13 induzieren (164).

Die An- oder Abwesenheit eines hohen oder niedrigen Levels einer koordinierten Expression dieser Gene definiert zwei unterschiedliche Populationen von Asthmapatienten. Diese 3-Gen TH2-Signatur korreliert mit der IL-13- und der IL-5-Expression in der bronchialen Mucosa, der peripheren Eosinophilie sowie der Eosinophilie der Atemwege, dem Atemwegsremodeling als auch dem klinischen Ansprechen auf inhalative Cortikosteroide, jedoch nicht mit Atopie im Allgemeinen.

Eine zuverlässige Differenzierung in die unterschiedlichen molekularen Phänotypen ist aus Gründen der Therapiestratifizierung sinnvoll und notwendig. Eine ausgeprägte Eosinophilie im Asthma ist ein zuverlässiger Prädiktor das Ansprechen auf inhalative Cortikosteroide betreffend. Doch insbesondere vor dem Hintergrund molekular basierter Therapien ist eine Differenzierung in TH2-hoch oder TH2-niedrig notwendig, da Behandlungsstrategien, welche auf eosinophile, TH2-getriebene Inflammation in Form der hier involvierten Zytokine als Target abzielen, naturgemäß nur in Patienten wirksam sein können, wo auch eine Eosinophilie vorhanden ist bzw. deren Asthma eine TH2-hoch-Signatur mit dem entsprechenden Signalweg und den entsprechenden spezifischen Zytokinen zugrunde liegt. Vor diesem Hintergrund demonstrieren die einleitend zitierten Studien zu Mepolizumab und Reslizumab - zwei monoklonale Antikörper gegen das TH2-Zytokin Interleukin-5 - die Wichtig- und Notwendigkeit des Selektierens von Asthmapatienten, um einen signifikanten Benefit durch die Behandlung mit diesen Target basierten Therapeutika zu erhalten. Insbesondere in Fällen von schwerem, inhalativen Cortikosteroiden

gegenüber resistentem Asthma, ist so durch die Selektion die Möglichkeit gegeben, einen möglichen oder wahrscheinlichen Therapieerfolg mit molekularen Therpieansätzen vorauszusagen.

Durch Gene-Expression-Profiling in Proben bronchialer Atemwegs-Epithelien von Asthmapatienten konnten verschiedene Gene identifiziert und charakterisiert werden, welche zum einen den TH2-Endotypen definieren, zum anderen jedoch auch potentielle, klinisch brauchbare, periphere Biomarker einer TH2-getriebenen, eosinophilen Atemwegsinflammation darstellen; darunter das Periostin.

Periostin ist, wie bereits kurz skizziert wurde, ein sezerniertes, matrizelluläres Protein, assoziiert mit Fibrose und Mucus-Produktion. Es ist möglich, die Periostin-Expression durch rekombinantes IL-4 und IL-13 in kultivierten bronchialen Epithelzellen (164) sowie bronchialen Fibroblasten (146) herauf zu regulieren. Es werden in vivo sowohl in einem Mausmodel als auch einem Rhesusmodel des Asthma bronchiale erhöhte Level exprimiert. Darüber hinaus finden sich sowohl in bronchialen Epithelzellen als auch im subepithelialen bronchialen Gewebe humaner Asthma Patienten erhöhte Expressionslevel (146). Im humanen Asthma Patienten wiederum korrelieren die Periostinexpressionslevel mit der Dicke der retikulären Basalmembran, einem Indikator der subepithelialen Fibrose.

Im Gegensatz zum Chloride-channel accessory protein 1, welches mit der Mucussekretion assoziiert ist und auf der apikalen Oberfläche von bronchialen Epithelzellen und Becherzellen lokalisiert ist, wird Periostin nach IL-13-Stimulierung von der basolateralen Oberfläche her durch bronchiale Epithelzellen in die extrazelluläre Matrix sezerniert.

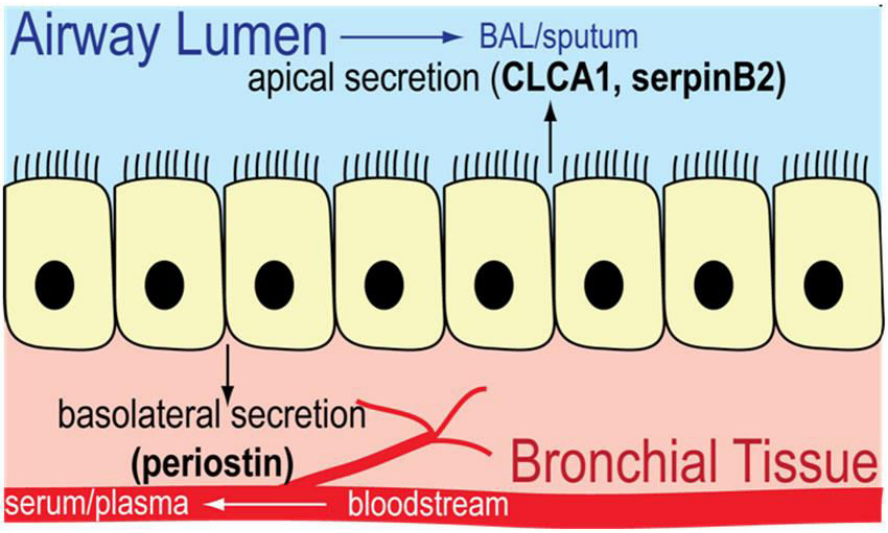


Abb. 43: Sekretion von Periostin, CLCA1 und PAI 2 entweder basolateral oder apikal durch bronchiale Epithelzellen. Aus Sidhu SS (138).

Ebenso wie CLCA1 wird auch PAI 2 in das Lumen der Atemwege sezerniert. Periostin ist im Gegensatz hierzu, da es basolateral in die extrazelluläre Matrix des bronchialen Gewebes sezerniert wird und nicht apikal in das Lumen der Atemwege, mit deutlich größerer Wahrscheinlich systemisch im peripheren Blut messbar. CLCA1 und PAI 2 stellen Proteine dar, die eher im Sputum oder der BAL gemessen werden könnten.

Weiterhin wird Periostin in einer IL-13 abhängigen Weise in nasalen Polypen in Assoziation mit ASS-sensitivem Asthma sowie im ösophagealen Epithel von Patienten mit eosinophiler Ösophagitis überexprimiert (1, 141). Vor diesem Hintergrund mag es eine Rolle spielen im Hinblick auf die Gewebeinfiltration von Eosinophilen in einem TH2-getriebenen Entzündungsprozess. Insofern könnten in zukünftigen Untersuchungen die Periostinlevel im peripheren Blut hinsichtlich durch TH2-Inflammation und Gewebe-Eosinophilie charakterisierter Krankheiten, wie beispielsweise nasale Polyposis, allergische Rhinitis, atopische Dermatitis und eosinophile Ösophagitis untersucht werden.

Um zu untersuchen, ob die TH2-Signatur für systemische Biomarker der Atemwegs-Eosinophilie in Patienten mit schwerem, gegenüber inhalativen Cortikosteroiden refraktärem Asthma kodiert, haben Jia et al. (77) einen ELISA für Serum-/Plasma-Periostin ähnlich dem in der vorliegenden Arbeit etabliert und evaluiert.

Hier konnte der Nachweis, dass Serumperiostin ein geeigneter Biomarker für die persistierende Atemwegseosinophilie trotz ICS-Behandlung in Patienten mit schwerem Asthma ist, erbracht werden (77, 123).

Es zeigten sich deutlich erhöhte Plasma-Periostin-Level in einer Teilgruppe der untersuchten Asthmatiker und darüber hinaus zeigte es sich signifikant korreliert mit einer Eosinophilie der Atemwegsinflammation (77).

Obschon eine Behandlung mit inhalativen Cortikosteroiden nachweislich sowohl die Periostin-Expression als auch die Atemwegs-Eosinophilie im Falle von Patienten mit mildem bis moderatem Asthma reduziert (164, 18), zeigt eine Untergruppe von Asthmatikern persistierende eosinophile Atemwegsinflammation und Asthmasymptome trotz hoher Dosen von Steroiden. Diese Subgruppe lässt sich anhand der oben genannten Kriterien einteilen in eine Subpopulation mit Sputum-Eosinophilie und / oder durch Biopsie gesicherter Gewebe-Eosinophilie und einer Subpopulation ohne diese Kriterien (Sputum-Eosinophile <3% und Gewebe-Eosinophile < 22/mm²).

Die mittleren Periostinlevel zeigen sich nun signifikant höher in Individuen mit hoher Anzahl von Eosinophilen (Sputum und/oder Gewebe) als von Individuen mit geringer Eosinophilenanzahl (77). Individuen mit einem Periostinlevel oberhalb eines Cutoff von 25 ng/ml haben eine über 85%ige Wahrscheinlichkeit entweder eine erhöhte Eosinophilenzahl im bronchialen Epithelgewebe oder im Sputum aufzuweisen. Eosinophil-niedrig und Eosinophil-hoch lässt sich anhand des Periostin Cutoffs von 25 ng/ml mit einem positiven prädiktivem Wert von 93% differenzieren (77). Vor diesem Hintergrund stellt Periostin einen

systemischen Biomarker der persistierenden Atemwegseosinophilie trotz ICS-Behandlung dar (77).

Ein Vergleich der Atemwegseosinophilie mit anderen nichtinvasiven Biomarkern wie dem Anteil des exhalierten Stickoxids (FeNO) – ein ausgeatmetes Gas, das durch das induzierbare Enzym Nitric Oxid Synthase in entzündeter bronchialer Mucosa entsteht - , den peripheren Bluteosinophilen, oder dem Serum-IgE verdeutlicht die herausragende Rolle des Periostin. Das exhalierte Stickoxid korreliert zwar auch mit der Atemwegseosinophilie und ist in Eosinophil-hoch-Patienten signifikant höher als in Eosinophil-niedrig-Patienten, doch zeigt Periostin von allen bislang untersuchten nicht-invasiven Biomarkern die größte Signifikanz, um als singulärer Prädiktor die Atemwegseosinophilie - stellvertretend für eine TH2-getriebene Inflammation - vorherzusagen. Die Expressionslevel von *POSTN* und *NOS*2 – das Gen, welches für die induzierbare NO-Sythase codiert – korrelieren signifikant miteinander wie auch mit der Expression von IL-13 und IL-5 in der bronchialen Mucosa (77).

Periphere Periostin-Level scheinen aber insgesamt ein Indikator von größerer Reliabilität für eine TH2-Inflammation zu sein als FeNO-Level, wohingegen Periostin und FeNO immer noch deutlich zuverlässigere Marker für eine TH2-getriebene Entzündung sind als alle anderen bisher untersuchten Indikatoren wie Blut-Eosinophilie, Serum-IgE oder weitere – dargestellt an den folgenden ROC-Kurven (77).

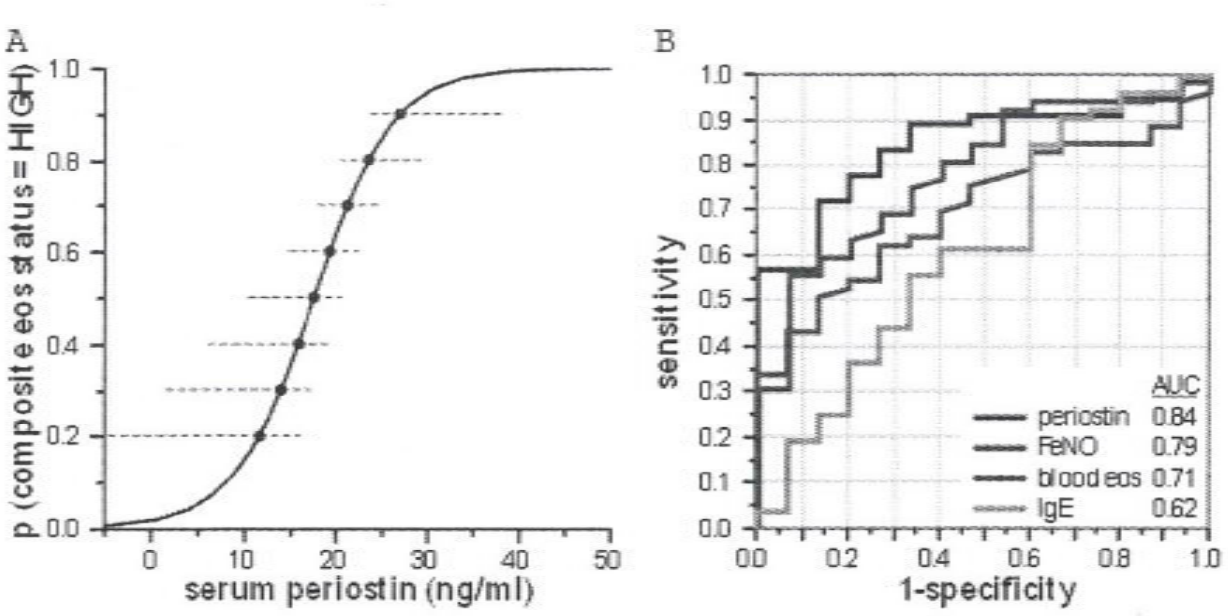


Abb. 44: Sensitivitäten von Biomarkern für eine eosinophile Atemwegsentzündung. A: Periostin als Funktion für die Wahrscheinlichkeit eines hohen Eosinophilen-Status, B: Receiver operating charakteristic curve (ROC) Analyse bezüglich Sensitivität und Spezifität von Serum Periostin, FeNO, Serum-IgE und Blut-Eosinophilie für den Eosinophilen-Status der Atemwege. Aus Jia et al. (77)

Da sich der TH2-Endotyp durch erhöhte Allergiemarker wie eosinophile Atemwegsinflammation, bronchiale Fibrose und Ansprechen gegenüber ICS auszeichnet, und da die Pathogenese einem TH2-Signalweg unter Mitwirkung von IL5, IL4 und IL13 folgt, und da peripheres Periostin dieses offensichtlich vorhersagen kann, könnte es sich als Surrogatmarker einer TH2-Inflamation und somit als Biomarker für den TH2-Endotypen eignen.

Man müsste noch explizit prüfen, ob Periostin nicht nur als Surrogatmarker für eine Eosinophilie und diese wiederum als Surrogatmarker für TH2-Signalwege dient, sondern darüber hinaus, ob es auch für die tatsächliche Heraufregulierung von typischen TH2-Genen, also die beschriebene TH2-Gen-Signatur, eine signifikante positive Korrelation mit den peripheren Periostinleveln gibt.

Auf jeden Fall ist bewiesen, dass Patienten mit schwerem Asthma und refraktärer ICS-Therapie (wobei TH2-Asthma in milden bis moderaten Fällen durchaus steroidsensitiv ist) im Falle von hohen peripheren Periostinleveln signifikant besser von einer IL-13-Blockade, also einer Blockade eines typischen TH2-Signalwegs, profitieren, als Patienten mit niedrigen Periostinwerten (26).

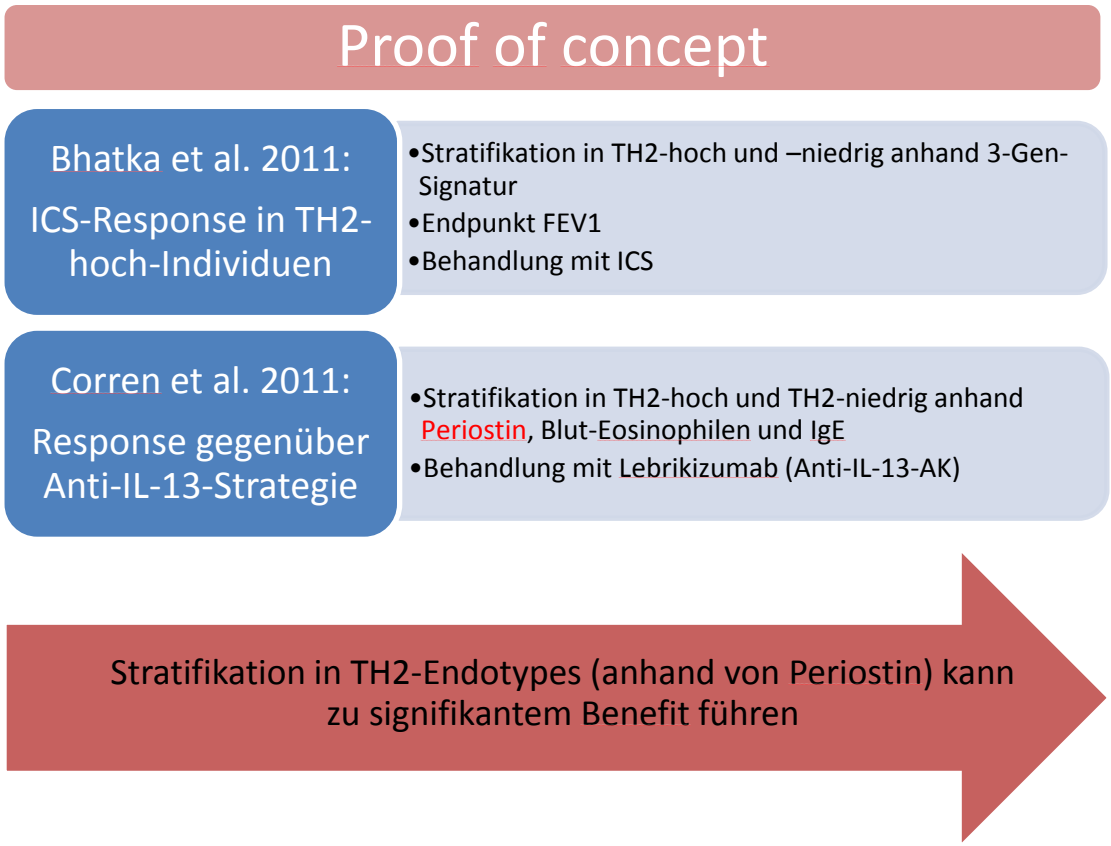


Abb. 45: Stratifizierung anhand von Periostin in TH2-Endotypen zeigt Signifikanz bezüglich ICS- und anti-IL-13-Behandlung.

Insofern scheint Periostin geeignet zu sein, TH2-hoch von TH2-niedrig zu differenzieren und kann dazu beitragen, durch Selektionierung in die jeweiligen Endotypen die Effizienz von Therapieansätzen, die auf TH2-Signalwege zielen, nicht mehr systematisch zu unterschätzen. Perspektivisch sollte durch Periostin eine Therapiestratifizierung möglich sein.

Tabelle 22: Struktur, Induzierbarkeit, Lokalisation, Funktion und Wirkung von Periostin

Struktur	90 kDA matrizelluläres Protein
	4 Isotypen durch alternatives Splicen
	Mitglied der Fascillin-Familie
	codiert durch POSTN-Gen
Induzierbarkeit durch	IL-4
	IL-13
	TGF-beta
Lokalisation	sezerniert durch Fibroblasten in die extrazelluläre Matrix
Interaktion / Liganden	Interaktion mit Integrin-Molekülen auf Zelloberflächen wie alpha-V/beta1, alpha-V/beta3 and alpha-V/beta5
Biologische Effekte	Moduliert Gewebe-Differenzierung, Wachstum und Remodeling
	Interaktion zwischen Periostin und ECM-Proteinen: Pathogenese der Fibrose
	Migration, Chemotaxis und Adhäsion von Eosinophilen: Verstärkung der TH2-Inflammation
	Inhibition der Mucus-Produktion

5.4 Fazit

Serum-Periostin-Level sind signifikant erhöht in Asthmapatienten mit Nachweis einer eosinophilen, TH2-getriebenen Inflammation der Atemwege im Gegensatz zu solchen Patienten mit einer nur minimalen eosinophilen Entzündung (77, 28). Durch logistische Regressionsmodelle kann nachgewiesen werden, dass Serum-/Plasma-Periostin der beste singuläre Prädiktor für eine Atemwegs-Eosinophilie ist. Diese wiederum stellt einen möglichen Surrogatmarker des TH2-Endotyps dar.

Anhand der Serum-/Plasma-Periostin-Level kann in einen molekularen TH2-hoch-Phänotyp und einen TH2-niedrig-Phänotyp bzw. in einen TH2-Endotypen und einen non-TH2-Endotypen differenziert werden, wobei unklar ist, ob der non-TH2-Endotyp abgesehen von den gesunden Kontrollen einem „TH1-Endotypen“ entspricht, oder ob es hier (vermutlich) noch weitere Endotypen gibt.

Periostin ist somit ein peripher messbarer, systemischer Biomarker nicht nur der Atemwegseosinophilie in Asthmapatienten, sondern auch ein Biomarker zur Identifikation des jeweiligen TH2-Endotyps. Somit hat Periostin das Potential im Sinne einer Therapiestratifizierung Patienten, die aufgrund des zugrundeliegenden TH2-Signalweges von einer Therapie mit einer Inhibierung von TH2-Targets profitieren können, zu selektionieren. Aufgrund dieser Fähigkeit vermag Periostin einen wahrscheinlichen Therapieerfolg nicht nur in Bezug auf inhalative Cortikosteroide vorauszusagen, sondern eben auch vor allem in Bezug auf neu entwickelte und zu entwickelnde Target-basierte Therapien.

Der evaluierte ELISA-Test ist den allgemeinen Gütekriterien entsprechend (soweit untersucht) in der Lage, im Serum signifikant zwischen gesunden Kontrollgruppen einerseits und akuter Inflammation und Atopie andererseits zu unterscheiden. Eine weitere Spezifizierung der Gütekriterien und Testcharakteristika anhand einer größeren Stichprobenmenge sowie eine Untersuchung, ob eine Diskriminierung in TH2-hoch und TH2-niedrig bzw. TH2-Endotyp und non-TH2-Endotyp möglich ist, hat anhand zytologisch oder molekularbiologisch (anhand des Goldstandards) vordefinierter Probanden zu folgen.

6. Zusammenfassung

Basierend auf der Tatsache, dass Asthma-Patienten nicht gleichermaßen von aktuellen, aus dem Verständnis der Pathogenese abgeleiteten, Target-basierten Therapieansätzen profitieren, lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass es innerhalb des Kollektivs aller Asthmatiker unterschiedliche Subgruppen gibt, welche dementsprechend auch unterschiedliche Signalwege in der Pathogenese beschreiten. Es stellt sich die Frage, inwieweit Responder und Non-Responder für molekulare Therapieansätze identifiziert werden können. Zur Definition unterschiedlicher Asthma-Phänotypen lassen sich bekanntermaßen klinische Kriterien zugrunde legen. Darüber hinausgehend lassen sich zytologische Phänotypen definieren. Hier spielt unter anderem der relative Anteil von Eosinophilen oder Neutrophilen im induzierten Sputum eine Rolle, so dass sich ein eosinophiles von einem neutrophilen und weiteren zellulären Typen unterscheiden lässt. Es gibt eine Assoziation zwischen klinischen sowie zellulären Phänotypen. Nachdem sich viele Target-basierten Therapien im Gesamtkollektiv als weniger oder nicht wirkungsvoll erwiesen haben, kann bei spezifischer Betrachtung einzelner zellulärer Phänotypen zumindest in einem Phänotyp ein Ansprechen auf Anti-Interleukin-5 nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit der Phänotypisierung, welche zugrundeliegende molekulare Signalwege der Pathogenese berücksichtigt, besteht in der Definition molekularer Phänotypen bzw. Endotypen. Durch Genom-weites Profiling mittels Microarray-Analysen kann im induzierten Sputum die Herauf- oder Herabregulation verschiedener Gene identifiziert werden, woraus sich eine molekular-immunologische Phänotypisierung bzw. ein spezifischer Endotyp ableiten lässt. Anhand des Expressionsmusters bildet sich auf der einen Seite Endotyp ab, welchem eine TH2-Inflammation zugrunde liegt. Auf der anderen Seite steht ein Endotyp, in dem die Differenzierung der TH0-Zellen zu TH2-Zellen nicht stattfindet oder eine untergeordnete Rolle spielt. Basierend auf dem Expressionslevel des Drei-Gen-Panels (*CLCA1, Periostin und Serpin B2*) kann zwischen TH2-Endotypen unterschieden werden, wobei es eine Assoziation der TH2-Gensignatur mit eosinophil dominierten zellulären Phänotypen gibt. Unterschiedliches Ansprechen des TH2-Endotyps im Sinne eines Responders auf Therapie, sowohl auf ICS als auch auf molekular basierte Therapiestrategien den TH2-Signalweg betreffend, konnte

nachgewiesen werden. Im Sinne einer Therapiestratifizierung erscheint es sinnvoll, Patienten im Hinblick auf ihrem jeweiligen Endotyp zu therapieren, die Rationale stellt hier die Blockade der im Signalweg einer TH2-Inflamation involvierten Zytokine dar. Zu diesem Zwecke ist es notwendig, einfach zu bestimmende Biomarker zu etablieren. Es wird vorgeschlagen, hierfür die Genprodukte der jeweils hochregulierten TH2-Gene mittels ELISA im Serum oder Plasma zu bestimmen. Zur Diskussion stehen die Proteine der als hochreguliert identifizierten Gene, wie CLCA1, Periostin, Serpin B2 (PAI2), die Ratio aus MUC5AC und MUC5B, Osteopontin, CCL 26 (MIP4) und CarboxypeptidaseA3. Hierzu ist es in einem ersten Schritt notwendig in Ermangelung geeigneter Testsysteme zunächst Testverfahren für die jeweiligen Proteine zu validieren und in drei Testgruppen, nämlich einer gesunden Kontrollgruppe, einer Gruppe der akuten Inflammation sowie einer Gruppe von Atopikern, anzuwenden. In einem weiteren Schritt wird anhand von aktuellen Studien und Erkenntnissen aus der Grundlagenwissenschaft nachvollzogen, ob die jeweiligen Proteine aufgrund ihrer strukturellen Beschaffenheit, ihrer Funktion im Inflammationsgeschehen und ihrer Lokalisation geeignet sind, einen TH2-Endotyp in der Peripherie abzubilden.

Zusammengefasst erweisen sich die jeweiligen ELISA-Testsysteme als unterschiedlich brauchbar. Bezüglich ihrer Eignung als potentielle Biomarker zur Vorhersage eines TH2-Endotyps erweisen sich die acht Proteine ebenfalls als heterogen. **CLCA1** ist ein in zwei unterschiedlichen Formen anzutreffendes Protein, welches eine regulierende Funktion in Bezug auf Ca^{2+}abhängigeCl^{-}-Kanäle des respiratorischen Epithels hat und somit Einfluss auf die Zusammensetzung des Mucus hat. Als membranassoziiertes bzw. in die ECM des respiratorischen Epithels sezerniertes Protein eignet es sich zur systemischen Detektion weniger, was die Messergebnisse bestätigen. **CarboxypeptidaseA3** lässt sich als ein systemisch im Plasma nachweisbares Protein einigermaßen zuverlässig messen, jedoch kann bislang keine Evidenz erbracht werden, ob es geeignet ist, statistisch signifikant zwischen TH2-hoch und TH2-niedrig zu differenzieren. **CCL26 bzw. MIP4** ist grundsätzlich im peripheren Blut zufriedenstellend quantifizierbar. Es hat im Inflammationsgeschehen die Funktion eines auf Eosinophile und auch Basophile wirkendendes Chemokins. Ebenfalls **SerpinB2 (PAI2)** lässt sich einigermaßen zufriedenstellend in der Peripherie quantifizieren, insbesondere im Rahmen einer akuten Inflammation. PAI2 liegt einerseits als intrazellulärer Messenger

vor, sowie in einer extrazellulären, in die Hämostase involviertes Protein. In Analogie zu CCL26 und CPA3 stellt sich bezüglich der Eignung als Biomarker einer TH2-Entzündung die Frage, ob PAI2 zuverlässig zwischen TH2-hoch und –niedrig unterscheiden kann, oder ob die genannten Proteine im Inflammationsgeschehen allgemein mit einer erhöhten Wertelage anzutreffen sind. Zur Klärung dieser Frage müssten molekularbiologisch (PCR) identifizierte TH2-Endotypen mit Non-TH2-Endotypen unterschiedlicher Spezifikation verglichen werden, um eine Signifikanz bezüglich der vermeintlich höheren Wertelage nachzuweisen. **Osteopontin** lässt sich zufriedenstellend im peripheren Blut messen mit bemerkenswerten Unterschieden in den jeweiligen Gruppen. Hier stellt sich ebenfalls das Problem, ob Osteopontin nicht ein zu allgemeiner Inflammationsmarker ist. Es gibt Evidenz, dass Osteopontin eine Funktion in der Entwicklung von TH1-Entzündungen hat und TH2-antagonistisch wirkt. Auch ist der Zeitpunkt in der Allergieentwicklung, zu welchem es seine Wirkung entfaltet, bedeutsam. Insgesamt ist die Rolle des Osteopontin sehr komplex und noch nicht gut genug verstanden, als dass es sich als zuverlässiger Biomarker eignen würde. Die **Mucine 5AC und 5B** lassen sich deutlich im peripheren Blut quantifizieren. MUC5AC ist bei TH2-Endotypen herauf reguliert, während MUC5B eher eine Clearancefunktion in den kleinen Atemwegen zugeschrieben wird und beim TH2-Endotyp herunter reguliert wird. Insofern müsste die Ratio zugunsten des MUC5AC verschoben sein, und somit stellt die Ratio in der Theorie einen sinnvollen Biomarker da. Eine signifikant erhöhte Ratio ließe sich jedoch nur durch Untersuchung an vorselektionierten Proben nachweisen. **Periostin** kann als Plasmaprotein systemisch gemessen werden. Periostin spielt eine Rolle in der Fibroseentstehung durch Interaktion mit ECM-Proteinen sowie in der Migration und Adhäsion von Eosinophilen. Die in TH2-Endotypen nachgewiesene Heraufregulation von *POSTN* lässt sich positiv mit dem eosinophilen zellulären Phänotyp korrelieren. Auch lässt sich anhand molekularbiologisch vordefinierter TH2-Endotypen (Drei-Gen-Panel) ein signifikanter Zusammenhang zwischen der allgemeinen TH2-hoch-Gensignatur und den peripheren Periostinleveln finden. Es kann nachgewiesen werden, dass nach erfolgter Stratifizierung anhand des peripheren Periostins eine IL-13-Blockade durch mAB zu signifikanten Ergebnissen führt. Insofern stellt Periostin einen brauchbaren, peripher und zuverlässig zu messenden Biomarker zur Identifikation des TH2-Endotyps dar.

7. Summary

Due to the fact that BA-patients do not benefit similarly from current pathogenesis-derived and target-based therapies it can be reasoned that there are different subsets of BA-patients within the collective of all BA-subjects, which follow according to this variable signal pathways in the pathogenesis. Subsequently the question comes up in how far responder and non-responder according to molecular based therapy strategies can be identified. Distinct BA-phenotypes can be defined by the use of clinical criteria, and beyond that there is the possibility to define a phenotype based on cytological criteria. For this purpose the percentage of eosinophils and neutrophils in the induced sputum is an essential criterion, so that an eosinophilic asthma can be distinguished from a neutrophilic BA and other cellular subtypes. There is an association or a correlation between clinical and cellular defined phenotypes. After numerous target-based therapeutic approaches proved less or not effective in the whole collective considering the specific cellular phenotypes a response to anti-IL-5-antibodies could be demonstrated with regard to a particular cellular phenotype. A further approach of phenotyping which considers the underlying signaling pathways is the definition of molecular phenotypes or endotypes respectively. By genome wide profiling using microarray analyses the up or down regulation of distinct genes can be identified in the induced sputum, whereby a molecular immunological phenotype respectively specific endotype can be derived. On the basis of the pattern of gene expression one particular endotype becomes apparent which underlies a TH2-driven inflammation. On the other side an endotype emerges where a differentiation of T-cells into TH2-cells does not occur or plays a minor role. On the basis of the expression level of the 3-gene-panel consisting of CLCA1, periostin and serpinB2 can be divided between TH2-endotypes, while there is an association of the TH2-gene-signature with eosinophilic dominated cellular phenotypes. A different response of the TH2-endotype to therapeutic approaches such as ICS as well as molecular based strategies targeting the TH2 signal pathway could be proven. In terms of stratifying of therapy it seems to be meaningful to treat patients with regard to their special endotype, the rationale here is the blockade of the cytokines involved in the TH2 signal pathway. For this purpose it is

necessary to establish biomarkers which are easy to receive and to measure. It is proposed to quantify the gene products of the up regulated genes for this purpose in the serum or plasma by using ELISA. The proteins of the as up regulated identified genes such as CLCA1, periostin, serpinB2 (PAI2), the ratio of MUC5AC and MUC5B, osteopontin, CCL26 (MIP4) and carboxypeptidaseA3 are under consideration. Due to lack of suitable test systems it is required in a first step to establish and validate ELISAs for the particular proteins and to evaluate these tests in the three subsets of healthy controls, acute inflammation and atopic subjects. In a further step it will be reviewed on the basis of current studies and findings whether the particular proteins are suitable peripheral surrogate markers for a TH2-endotype by reasons of their structure, their function in the inflammation process as well as their localization.

In summary the particular ELISA test systems crystallize as different suitable. With regard to their qualification as potential biomarkers to predict a TH2-endotype they seem to be heterogeneous as well. CLCA1 is a protein which appears in two distinct forms, that have a regulating function with regard to Ca2+-dependent chloride channels in the respiratory epithelium and which has influence on the composition of mucus in so far. As a membrane associated protein or a protein secreted into the ECM, CLCA1 is not suited for a systemic detection, which is proven by the measurement results. CarboxypeptidaseA3 as a protein which is systemically detectable in the plasma can be quantified reliably; however there is no evidence whether it is able to distinguish significantly between TH2-high and TH2-low. CCL26 (MIP4) is generally satisfactorily quantifiable in the plasma. In the inflammation process it has the function of a chemokine affecting eosinophils and eventually basophils. Also serpinB2 (PAI2) can be quantified reasonably in the periphery, notably in the context of an acute inflammation. On the one hand PAI2 acts as an intracellular messenger, on the other hand it exists as an extracellular protein which is involved in affairs of hemostasis. Analogous to CCL 26 and CPA3 it is questionable - with regard to the suitability to serve as a biomarker of a TH2-inflammation – if PAI2 can distinguish reliably between TH2-high and TH2-low or if the mentioned proteins occur generally on a high level within the inflammation process. To answer this question TH2-endotypes identified by molecular biology (PCR) have to be compared to non-TH2- endotypes of different specification to prove significance with regard to the assumed higher amounts of

protein in the TH2-high subset. Osteopontin can be measured satisfactorily in the peripheral blood with remarkable differences in the particular subsets. Here also exists the problem if osteopontin is probably a too common marker of inflammation in general. There is evidence that osteopontin has a function in the development of TH1-inflammation and acts TH2-antagonistic. Also the point in time of the development of allergic inflammation in which osteopontin occurs is important. Altogether the role of osteopontin is very complex and less understood than to serve as a suitable biomarker. The mucins 5AC and 5B can be quantified in the peripheral blood very well. MUC5AC is up regulated in TH2-endotypes, whereas MUC5B is rather down regulated in the TH2-endotype and has probably a clearance function of the small airways. Insofar the ratio of MUC5AC and MUC5B should be shifted towards MUC5AC and therefore serves as a reasonable biomarker in theory. A significant elevated ratio can only be proven by analyses of pre-selected endotypes. Periostin can be quantified systemically in the plasma. Periostin plays a role in the development of fibrosis by interaction with ECM-proteins as well as in the migration and adhesion of eosinophils. The up regulation of POSTN proved in TH2-endotypes can be positively correlated with the eosinophilic cellular phenotype. There is also a significant correlation between the TH2-high gene-signature in general and the peripheral levels of periostin, when analyzing the molecular defined TH2-endotype (by 3-gene-panel). It can be proven that after stratifying by means of the peripheral periostin level an IL-13-blockade by mAB leads to significant results. Insofar periostin can serve as a suitable, peripheral and reliable biomarker for the identification of the TH2-endotype.

8. Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

1. Abbas AR et al. Lung gene expression in a rhesus allergic asthma model correlates with physiologic parameters of disease and exhibits common and distinct pathways with human asthma and a mouse asthma model. Am J Pathol 2011; 179: 1667-80
2. Abonyo B O, Alexander M S, Heiman A S, Autoregulation of CCL 26 synthesis and secretion in A549 cells: a possible mechanism by which alveolar epithelial cells modulate airway inflammation, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 289: L478-L488
3. Akiho H, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002; 282: G226-G232
4. Arron JR, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthma. Am J Respir Crit Care Med 2011: 183: A4455
5. Asher, M. I. and Weiland, S. K., The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. Clin Exp Allergy, 1998. 28 Suppl 5: p. 52-66
6. Averbeck M, et al. Immunologic principles of allergic disease. J Dtsch Dermatol Ges 2007;5(11):1015-28
7. Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R.: Multivariate Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung. 12. Auflage, Springer, Berlin 2008, ISBN 3-540-27870-2
8. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. J Allergy Clin Immunol 2011; 127: 153-60, 160.
9. Beeh KM, Buhl R. (2001) Asthma Pathogenesis – Implications for Novel Therapies. Medizinische Klinik 96: 15-25
10. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS: Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. In: Nat. Rev. Cancer. 8, Nr. 3, März 2008, S. 212–226
11. Berry M, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. Thorax 2007; 62: 1043-1049
12. Berry MA et al. Clin Exp Allergy 2005
13. Besag, Clifford: Sequential Monte Carlo p-values. In: Biometrika Nr. 78(2), 1991. S. 301-304.
14. Bhakta NR, Woodruff PG. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. Immunol Rev 2011; 242: 220-232
15. Blanchard C, et al. Periostin facilitates eosinophil tissue infiltration in allergic lung and esophageal responses. Mucosal Immunol. 2008;1(4):289–296.
16. Bortz, Jürgen; Christof Schuster: Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 7 Auflage. Springer, Berlin 2010, ISBN 978-3-642-12769-4.
17. Bortz, Jürgen; Gustav A. Lienert, Klaus Boehnke: Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. 3 Auflage. Springer Berlin Heidelberg, 20. März 2008, ISBN 978-3540747062.
18. Boushey HA et al. Daily versus as-needed corticosteroids for mild persistent asthma. N Engl J Med 2005;119:1337-48
19. Bousquet J, Jeffrey PK, Busse WW. (2000) Asthma – From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. Am J Respir Crit Care Med 161: 1720-1745
20. BRAUN-FAHRLANDER, C., M. GASSNER, L. GRIZE, U. NEU, F. H. SENNHAUSER, H. S. VARONIER, J. C. VUILLE und B. WUTHRICH (1999). Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community.

SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. Clin Exp Allergy, 29(1):28–34.
21. Brightling CE, Green RH, Pavord ID. Biomarkers predicting response to corticosteroid therapie in asthma. Treat Respir Med 2005; 4: 309-316
22. CELEDON, JUAN C., R. J. WRIGHT, A. A. LITONJUA, D. SREDL, L. RYAN, S. T. WEISS und D. R. GOLD (2003). Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. Am J Respir Crit Care Med, 167(9):1239–43.
23. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. (November 2001). "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease". Science 294 (5547): 1731–5.
24. Chen Y, Thai P, Zhao YH, Ho YS, DeSouza MM, Wu R. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop.
25. Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG, Arron JR. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. J Immunol 2011; 186: 1861-1869
26. Christel Weiß: Basiswissen Medizinische Statistik. 5 Auflage. Springer, Berlin 2010, ISBN 978-3-642-11336-9.
27. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. Annu Rev Immunol 2004;22:789–815.
28. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. N Engl J Med 2011; 365: 1088-98
29. Delimpoura V, et al. Increased levels of osteopontin in sputum supernetant in severe refractory asthma. Thorax 2010; 65: 782-786
30. DIN 32645: Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung.
31. Dougherty RH, et al. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(5): 1046-1053
32. Draper, Norman R. und Smith Harry: Applied Regression Analysis. Wiley, New York 1998
33. Endo, Y., Isono, K., Kondo, M., Tamaoki, J., Nagai, A.Interleukin-9 and Interleukin-13 augment UTP-induced Cl ion transport via hCLCA1 expression in a human bronchial epithelial cell line. Clin. Exp. Allergy (2007)
34. Espinosa K, Bosse Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 1032-1040
35. Eum SY, Maghni K, Tolloczko B, Eidelman DH, Martin JG. IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 288: L576-L584
36. Evans CM, et al. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. Curr Opin Pulm Med. 2009; 15(1): 4-11
37. Fahrmeir, L. u. a. (Hrsg): Multivariate statistische Verfahren. 2. überarbeitete Auflage. Walter de Gruyter, Berlin u. a. 1996, ISBN 3-11-013806-9.
38. Fahrmeir, Ludwig u. a.: Statistik. Der Weg zur Datenanalyse. 2. verbesserte Auflage. Springer, Berlin u. a. 1999, ISBN 3-540-65053-9 (Springer-Lehrbuch).
39. Fahrmeir, Ludwig; Kneib, Thomas; Lang, Stefan: Regression: Modelle, Methoden und Anwendungen, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2007, ISBN 978-3-540-33932-8.
40. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. J Allergy Clin Immunol 1995; 95: 843-852
41. Farzan S. et al. The asthma phenotype in obese: distinct or otherwise? J Allergy (Cairo) 2013; 2013:602908
42. Fort MM, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity 2001; 15: 985-995

43. Frei R, et al. Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis. Immunobiology 2007; 212(6):441-52
44. FREI, R., R. P. LAUENER, R. CRAMERI und L. O'MAHONY (2012). Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis? Allergy, 67(4):451–61.
45. Frenzel DF, Weiss JM. Osteopontin and allergic disease: pathophysiology and implications for diagnostics and therapy. Expert Rev Clin Immunol, 2011; 7(1): 93-109
46. Galton, Francis: Co-relations and their measurement, chiefly from anthropometric data. In: Proceedings of the Royal Society. 45, Nr. 13, 5. Dezember 1888, S. 135-145
47. GARN, HOLGER und H. RENZ (2007). Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. Immunobiology, 212(6):441–52.
48. Gauvreau GM, Boulet LP, Cockcroft DW, Fitzgerald JM, Carlsten C, Davis BE et al. Effects of interleukin-13 blockade an allergen induced airway responses in mild atopic asthma. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183: 1007-14
49. Gibson A, Lewis AP et al. hCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. J Biol Chem 2005; 280: 27205-27212
50. Gibson PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. Clin Respir J 2009; 3: 198-206
51. Gillan L. et al. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. Cancer Res 2002
52. Goodman, Steven: A Dirty Dozen: Twelve P-Value Misconceptions. In: Seminars in Hematology. Nr. 45, 2008. S. 135-140
53. Grange C.L. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. NEJM 2011; 364(21):2006-15
54. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identifikation of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. Thorax 2002; 57: 875-879
55. Gruber AD, Elble RC, Ji HL, Schreur KD, Fuller CM, Pauli BU.: Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca^{2+}-activated Cl^- channel proteins. Genomics 1998;54:200–214.
56. Grunig G, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. Science 1998; 282: 2261-2263
57. Grunstein MM, et al. IL-13-dependent autocrine signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 282: L520-L528
58. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A et al. Mepulizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med 2009; 360: 973-84
59. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. J Allergy Clin Immunol 2007; 119: 1043-1052
60. Hallstrand et al. Inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction. Am J Respir Crit care Med 2005; 172(6):679 – 876
61. Hallstrand TS, Moody MW et al. Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. J Allergy Clin Immunol 2005; 116(3):586-93
62. Hartung, Joachim: Statistik, 12. Auflage, Oldenbourg Verlag 1999, S. 561 f, ISBN 3-486-24984-3
63. Hastie AT, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulozytes. J Allergy Clin Immunol 2010; 125: 1028-1036.e1013
64. Hayashi N, et al. T-helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-gamma and IL-13 production. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104(37): 14765-14770

65. Hegab, A.E., Sakamoto, T., Uchida, Y., Nomura, A., Ishii, Y., Morishima, Y., Mochizuki, M., Kimura, T., Saitoh, W., Massoud, H.H., Massoud, H.M., Hassanein, K.M., Sekizawa, K. J. CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. Med. Genet. (2004)
66. HEINRICH, J., B. HOELSCHER, C. FRYE, I. MEYER, M. WJST und H. E. WICHMANN (2002). Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. Eur Respir J, 19(6):1040–6.
67. Helenius et al. Respiratory symptoms, bronchial responsiveness, and cellula characteristics of induced sputum in swimmers. Allergy 1998; 53(4):346-52
68. Helenius IJ et al. Asthma and increased bronchial responsiveness in elite athletes: atopy and sport event as risk factors. J Allergy Clin Immunol 1998;101(5):679-86
69. Hillas G, Loukides S, Kostikas K, Simoes D, Petta V, Konstantellou E, Emmanouil P, Papiris S, Koulouris N, Bakakos P (Jan 2013). "Increased levels of osteopontin in sputum supernatant of smoking asthmatics.". Cytokine. 61 (1): 251-5.
70. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol 2008; 8: 218-30
71. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1239-49.
72. Hoshino M, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Nagi T, Nakanishi A, Ashida Y, Nishimura O, Fujisawa Y, Fujino M. Increased expression of the human Ca2+- activated Cl2 channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1132–6.
73. Humbert M, et al. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and non atopic subjects with asthma. J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 657-665
74. IBELGAUFTS, HORST (2009). Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia (COPE).http://www.copewithcytokines.de, Version 22.6, eingesehen am 22.11.2009.
J Biol Chem 2003;278:17036–17043
75. Jackson DJ et al. Wheezing rhinovirus illness in early life predict asthma developement in high-risk children. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178(7):667-72
76. Jacobs JP, Pettit AR, Shinohara ML, et al. (August 2004). "Lack of requirement of osteopontin for inflammation, bone erosion, and cartilage damage in the K/BxN model of autoantibody-mediated arthritis". Arthritis Rheum. 50 (8): 2685–94.
77. Jia G, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic aiway inflammation in asthmatic patients. J Allergy Cin Immunol 2012; 130(3): 647-654
78. Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Tsunemi Y, Nakamura K, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. Clin Exp Immunol. 2005 Sep;141(3):459-66.
79. Karjaleinen EM et al. Evidence of airway inflammation and remodeling in ski athlets with and without bronchial hyperresponsiveness to metacholine. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161(6):2086-91
80. Katsuragi N, et al. Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation. Circulation 2004; 110: 1806-1813
81. Kay AB et al. Allergy and allergic diseases. First oft wo parts. N Engl J Med 2001; 344(1):30-7
82. Kii I, et al. Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular matrix meshwork architecture. J Biol Chem. 2010; 285(3): 2028-2039
83. Kim CH, Song KS, Koo JS, Kim HU, Cho JY, Kim HJ, Yoon JH. IL-13 suppresses MUC5AC gene expression and mucin secretion in nasal epithelial cells. Acta Otolaryngol 2002;122:638–643.

84. Kirkham S, et al. Heterogenity of airway mucus: variations in the amounts and glycoforms oft he oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. Biochem. J. 2002; 361:537-546
85. Kohn, Wolfgang: Statistik: Datenanalyse und Wahrscheinlichkeitsrechnung. Springer, 15. September 2004, ISBN 978-3540216773, S. 81.
86. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Nakata J, Nagai A. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2002;27:536–541.
87. Konno S, et al. Interleukin 10 an Th2 Cytokines differentially regulate osteopontin expression in human monocytes and dendritic cells. J Interferon Cytokine Res 2006; 26(8): 562-567
88. Kroegel C. Asthma bronchiale. Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 2002
89. Kroegel C. Asthmatherapie Leitfaden einer pathogenetisch begründeten Therapie. Steinen: ZETT-Verlag 2001
90. Kruzynska-Frejtag A, et al. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation. Mech Dev 2001;103:183-188
91. Kühn B, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. Nat Med 2007; 10:962-969
92. LEMANSKE, ROBERT F. JR und W. W. BUSSE (2010). Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. The Journal of allergy and clinical immunology, 125(2 Suppl 2):S95–102.
93. Li Y, et al. Enhanced expression of mucin genes in a guinea pig model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 25: 644-651
94. Loewen ME, Forsyth GW, Structure and function of CLCA1 proteins. Physiol Rev 2005
95. Loewen ME, Gabriel SE, Forsyth GW. The calcium-dependent chloride conductance mediator pCLCA1. Am J Physiol Cell Physiol 2002;283:C412–C421.
96. Manicassamy S, Pulendran B, et al. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. Semin Immunol 2009; 21(4):185-93
97. Martin RJ, et al. The predicting Response to Inhaled Corticosteroid Efficacy (PRICE) trial. J Allergy Clin Immunol 2007; 119: 73-80
98. Maruhashi T, et al. Interaction between periostin and BMP-1 promotes proteolytic activation of lysyl oxidase. J Biol Chem. 2010; 285(17): 13294-13303
99. Masuoka M et al.: Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. J Clin Invest 2012; 122(7): 2590-2600
100. McMillan SJ, Bishop B, Townsend MJ, McKenzie AN, Lloyd CM. The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. J Exp Med 2002;195:51–57.
101. Medcalf RL, Stasinopoulos SJ. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. The FEBS Journal 2005; 272: 4858-4867
102. Miller, Lisa a, Role of Eotaxin-3/CCL26 in Allergic Asthma
103. Moro K, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature 2009; 463:540-544
104. Mullane K. Asthma translational medicine: report card. Biochem Pharmacol 2011; 82: 567-85
105. MURPHY, KENNETH M., P. TRAVERS, M. WALPORT, C. A. JANEWAY, L. SEIDLER und M. EHRENSTEIN (2009). Janeway Immunologie. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg, 7. Aufl.
106. MUTIUS, E. VON und S. SCHMID (2006). The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. Allergy, 61(4):407–13.
107. Mutius, E. von: Epidemiologie des Asthma bronchiale. Monatsschr Kinderheilkd. 2001; 149:86 – 93

108. Mutius, E. von: Prävalenz und Determinanten des Asthma bronchiale. Monatsschr Kinderheilkd 2010; 158:121-128
109. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. N Engl J Med 2009; 360: 985-93
110. Nakanishi A, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Ashida Y, Shirafuji H, Fujisawa Y, Nishimura O, Fujino M. Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:5175–80.
111. NANDAKUMAR, SUBHADRA, C. W. MILLER und U. KUMARAGURU (2009). T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. Clin Mol Allergy, 7:5.
112. NICOLAI, T. und E. VON MUTIUS (1996). Respiratory hypersensitivity and environmental factors: East and West Germany. Toxicol Lett, 86(2-3):105–13.
113. NICOLAI, T., B. BELLACH, E. V. MUTIUS, W. THEFELD und H. HOFFMEISTER (1997). Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany. Clin Exp Allergy, 27(8):886–92.
114. NOWAK, D., J. HEINRICH, R. JORRES, G. WASSMER, J. BERGER, E. BECK, S. BOCZOR, M. CLAUSSEN, H. E. WICHMANN und H. MAGNUSSEN (1996). Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. Eur Respir J, 9(12):2541–52.
115. O´Garra A, et al. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. Trends Cell Biol 2000; 10(12):542-50
116. Opfer, Gerhard: Numerische Mathematik für Anfänger, 2. Auflage, 1994, Vieweg Verlag
117. Oppitz, Volker/Nollau, Volker: Taschenbuch Wirtschaftlichkeitsrechnung, Carl Hanser Verlag 2003, 400 S., ISBN 3-446-22463-7
118. Ordonez CL, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163: 517-523
119. PAPPU, BHANU P., P. ANGKASEKWINAI und C. DONG (2008). Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines. Pharmacol Ther, 117(3):374–84.
120. Pauli BU, Abdel-Ghany M, Cheng HC, Gruber AD, Archibald HA, Elble RC. Molecular Characteristics and functional diversity of CLCA family members. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000
121. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. Lancet 1999; 353: 2213-2214
122. Pawłowski K, Lepistö M, Meinander N, et al. (2006). "Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels.". Proteins. 63 (3): 424–39.
123. Porsbjerg C, Lund TK, Pedersen L, Backer V. Inflammatory subtypes in asthma are related to airway hyperresponsiveness to mannitol and exhales NO. J Astma 2009; 46: 606-612
124. Price AE, et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 11489-11494
125. Reinboth, C.: Multivariate Analyseverfahren in der Marktforschung, LuLu-Verlagsgruppe, Morrisville, 2006.
126. Rios H, et al. Periostin null mice exhibit dwarfism, incisior enamel defects, and an early-onset peridontal disease-like phenotype. Mol Cell Biol 2005; 25(24):11131-11144
127. Romagnani S, et al. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. J Allergy Clin Immunol 2004; 113(3):395-400

128. Rose MC, Piazza FM, Chen YA, Alimam MZ, Bautista MV, Letwin N, Rajput B. Model systems for investigating mucin gene expression in airway diseases. J Aerosol Med 2000;13:245–261.
129. Ruan K, et al. The multifaceted role of periostin in tumorgenesis. Cell Common Signal. 2008; 2(1-2): 9-17
130. Samitas K et al. Osteopontin expression and relation to disease severity in human asthma. Eur Respir J 2010; 37: 331-341
131. Samitas K, Zervas E, Xanthou G, Panoutsakopoulou V, Gaga M: Osteopontin is increased in the bronchoalveolar lavage fluid and bronchial tissue of smoking asthmatics. Cytokine, 2013
132. Schönfeld, Peter: Methoden der Ökonometrie, Berlin, Frankfurt, 1969
133. Schroeder WA et al. The role of SerpinB2 in immunity. Crit Rev Immunol 2011;31(1): 15-30
134. Sehra S, Yao W, Nguyen ET, Ahyi AN, Tuana FM, Ahlfeld SK, Snider P, Tepper RS, Petrache I, Conway SJ, Kaplan MH.: Periostin regulates goblet cell metaplasia in a model of allergic airway inflammation. J Immunol. 2011 Apr 15;186(8):4959-66.
135. Shaheen SO. Changing patterns of childhood infection and the rise in allergic disease. Clin Exp Alergy 1995; 25 (11):1034-7
136. Shim JJ, et al. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L134-L140
137. Shimazaki M, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. J Exp Med. 2008; 205(2): 295-303
138. Sidhu SS, et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-β activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(32):14170–14175.
139. Simoes DC, Xanthou G, Petrochilou K, Panoutsakopoulou V, Roussos C, Gratziou C (May 2009). "Osteopontin deficiency protects against airway remodeling and hyperresponsiveness in chronic asthma". Am J Respir Crit Care Med. 179 (10): 894–902.
140. Snider P, et al. Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyozyte lineages oft he heart. Circ Res. 2008;102(7): 752-760
141. Stankovic KM et al. Gene expression profiling of nasal polyps associated with chronic sinusitis and aspirin-sensitive asthma. Laryngoscope 2008;118:881-9
142. STRACHAN, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. BMJ, 299(6710):1259–60.
143. STRACHAN, D. P. (1997). Allergy and family size: a riddle worth solving. Clin Exp Allergy, 27(3):235–6.
144. Swartz JM et al. Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes. Journal of Leukocyte Biology 2004; 76: 812-819
145. Szefler SJ, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 410-418
146. Takayama G et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 98 – 104
147. Takeshita, S., R. Kikuno, K. Tezuka, E. Amann. 1993. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. Biochem. J. 294: 271–278.
148. Thai P, Differential Regulation of MUC5AC/Muc5ac an hCLCA-1/mGob-5 Expression in Aiway Epithelium, Am J Respir Cell Mol Biol. 2005; 33(6):523-30
149. Theodorsson, Elvar: Guidance for industry, Bioanalytical method validation, (2012) "Validation and verification of measurement methods in clinical industry" Bioanalysis 4(3) 305-320).

150. Tliba O, et al. IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle. Br J Pharmacol 2003; 140: 1159-1162
151. Toda M, Tulic MK, Levitt RC, Hamid Q. A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 2002;109:246–50.
152. Uchida M, et al. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012;46(5):677–686.
153. Urban, Dieter/ Mayerl, Jochen: Regressionsanalyse: Theorie, Technik und Anwendung, 2. überarb. Auflage, 2006, Wiesbaden: VS Verlag, ISBN 3-531-33739-4
154. Verrills NM, et al. Identification of novel Diagnostic Biomarkers for Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183; 1633-1643
155. Wang KX, Denhardt DT (2008). "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses". Cytokine Growth Factor Rev. 19 (5-6): 333–45.
156. Weinberger M. Consensus statement from a conference on treatment of viral respiratory infection induced asthma in young children. J Pediatr 2003; 142(2 Suppl):45-46
157. Weinberger M. Treatment strategies for viral respiratory infection-induced asthma. J Pediatr2003; 1423 (34-38)
158. Wenzel SE, et al. Evidence that severe asthma can be devided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic an clinical characteristics. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1001-1008
159. Wettengel, R. Asthma: Epidemiologie und aktuelle Therapiestandards. Innovartis 2/1999
160. Whittaker L, Niu N, Temann UA, Stoddard A, Flavell RA, Ray A, Homer RJ, Cohn L. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. Am J Respir Cell Mol Biol 2002;27:593–602.
161. Williams TJ. Et al. The eosinophil enigma. J Clin Invest 2004; 113: 507-509.
162. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science 1998;282:2258–2261.
163. Wolf, Christof und Henning Best (Hrsg.): Handbuch der sozialwissenschaftlichen Datenanalyse. Wiesbaden: VS-Verlag für Sozialwissenschaften, 2010. ISBN 9783531163390
164. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroides. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 15858-63
165. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Lia G, Abbas AR, Ellwanger A et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 388-95
166. Xanthou G et al. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. Nat Med 2007; 13, 570-579
167. Xu, R., Hanson, S.R., Zhang, Z., Yang, Y.-Y., Schultz, P.G., and Wong, C.-H.: Site-Specific Incorporation of the Mucin-Type N-Acetylgalactosamine-α-O-threonine into Protein in Escherichia coli J. Am. Chem. Soc., 126, 48, 15654 - 15655, 2004
168. Yu H, Maurer F, Medcalf RL. Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. Blood, 2002 Apr 15;99(8):2810-8
169. Yumoto K, Ishijima M, Rittling SR, et al. Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002; 99 (7): 4556–61
170. Yuyama, N., D. E. Davies, M. Akaiwa, K. Matsui, Y. Hamasaki, Y. Suminami, N. L. Yoshida, M. Maeda, A. Pandit, J. L. Lordan, et al. 2002. Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. Cytokine 19: 287–296.

171. Zaho J-J, et al. Osteopontin levels are elevated in patients with asthma. J Int Med Res 2011; 39(4): 1402-1407
172. Zeidler E et al. Taschenbuch der Mathematik (bekannt als Bronstein und Semendjajew), Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden 2003, ISBN 3-8171-2007-9
173. Zhao J et al. Interleukin-13-induced MUC5AC is regulated by 15-Lipoxygenase 1 Pathway in human bronchial epithel cells. Am J Respir Crit Care Med 2009; 179, 782-790
174. Zhou Y et al. A calcium-activated chloride channel blocker inhibits goblet cell metaplasia and mucus overproduction. Novartis Found. Symp 2002
175. Zhou Y, Dong Q, Louahed J, Dragwa C, Savio D, Huang M, Weiss C, Tomer Y, McLane MP, Nicolaides NC, Levitt RC. Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;25:486–91.
176. ZHOU, XIN, M. S. FRAGALA, J. E. MCELHANEY und G. A. KUCHEL (2010). Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 13(5):541–7.
177. Zhu Z, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest 1999; 103: 779-788
178. Zöfel, Peter: Statistik für Psychologen, Pearson Studium 2003, München, S. 154.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Th-Zell-Differenzierung, Regulation durch Zytokine und Transkriptions-faktoren. Aus O´Garra et al. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. Trends Cell Biol 2000; 10(12):542-50 (115)

Abb. 2: Dichotomie der TH1/TH2-Entwicklung aus TH0-Zellen vor dem Hintergrund beteiligter Zytokine, aus O´Garra et al. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. Trends Cell Biol 2000; 10(12):542-50 (115)

Abb. 3: aus Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol 2008; 8: 218-30 (70)

Abb. 4: Rolle des eosinophilen Granulozyten beim Atemwegsremodeling im Rahmen des Asthma bronchiale. Modifiziert nach Williams 2004. (161)

Abb. 5: aus Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol 2008; 8: 218-30 (70)

Abb. 6: aus Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. N Engl J Med 2009; 360: 985-93 (109)

Abb. 7: aus Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A et al. Mepulizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med 2009; 360: 973-84 (58)

Abb. 8: Zytologische Phänotypen, Assoziation zu klinischen Phänotypen, Proof of concept: spezifische zelluläre Phänotypen sprechen auf anti-IL-5-Therapie an.

Abb. 9: aus Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Transcriptional phenotypes of astha defined by gene expression profiling of induced sputum samples. J Allergy Clin Immunol 2011; 127: 153-60, 160. (8)

Abb. 10: Definition von drei translationalen Asthmaphänotypen

Abb. 11: aus Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Lia G, Abbas AR, Ellwanger A et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 388-95 (165)

Abb. 12: aus Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroides. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 15858-63 (164)

Abb. 13: aus Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Lia G, Abbas AR, Ellwanger A et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 388-95 (165)

Abb. 14: aus Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Lia G, Abbas AR, Ellwanger A et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 388-95 (165)

Abb. 15: aus Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Lia G, Abbas AR, Ellwanger A et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 388-95 (165)

Abb. 16: aus Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Lia G, Abbas AR, Ellwanger A et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180: 388-95 (165)

Abb. 17: aus Bhakta NR, Woodruff PG. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. Immunol Rev 2011; 242: 220-232 (14)

Abb. 18: aus Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. N Engl J Med 2011; 365: 1088-98 (28)

Abb. 19: aus Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG, Arron JR. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. J Immunol 2011; 186: 1861-1869 (25)

Abb. 20: aus Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG, Arron JR. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. J Immunol 2011; 186: 1861-1869 (25)

Abb. 21: aus Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG, Arron JR. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. J Immunol 2011; 186: 1861-1869 (25)

Abb. 22: aus Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG, Arron JR. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. J Immunol 2011; 186: 1861-1869 (25)

Abb. 23: Prozeß der Identifizierung des TH2-Endotyps

Abb. 24: Circulus vitiosos der allergischen Hautinflammation unter Beteiligung von IL-4, IL-13, Periostin und TSLP. Aus Masuoka, M. (99)

Abb. 25: Struktur der Mucine. Analog Xu, R. (167)

Abb. 26: Periostin, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 27: Osteopontin, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 28: CCL 26, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 29: PAI 2, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 30: CPA 3, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 31: MUC 5 AC, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 32: MUC 5 B, Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade

Abb. 33: CLCA1 Boxplot

Abb. 34: CPA 3 Boxplot,

Abb. 35: CCL 26 Boxplot

Abb. 36: Osteopontin Boxplot

Abb. 37: PAI 2 Boxplot

Abb. 38: Periostin Boxplot

Abb. 39: MUC 5 AC Boxplot

Abb. 40: MUC 5 B Boxplot

Abb. 41: Ratio MUC 5 AC / MUC 5 B

Abb. 42: Tryptase Boxplot

Abb. 43: Sekretion von Periostin, CLCA1 und PAI 2 durch bronchiale Epithelzellen. Aus Sidhu SS (138)

Abb 44: aus Jia G, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic aiway inflammation in asthmatic patients. J Allergy Cin Immunol 2012; 130(3): 647-654 (77)

Abb. 45: Stratifizierung anhand von Periostin in TH2-Endotypen zeigt Signifikanz bezüglich ICS- und anti-IL-13-Behandlung.

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zytokine und ihre Wirkungen

Tabelle 2: aus Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. J Allergy Clin Immunol 2007; 119: 1043-1052 (59)

Tabelle 3: Ein- und Ausschlußkriterien.

Tabelle 4: Patientencharakteristika.

Tabelle 5: Beschreibung der Antikörper

Tabelle 6: Standard und Antikörper USCN

Tabelle 7: assayspezifische Reagenzien USCN

Tabelle 8: Standard und Antikörper BlueGene

Tabelle 9: assayspezifische Reagenzien BlueGene

Tabelle 10: Standard und Antikörper Ray Bio

Tabelle 11: assayspezifische Reagenzien Ray Bio

Tabelle 12: Cut-off, Detection-Range, Kreuzreaktivität (Herstellerangaben)

Tabelle 13: weitere Materialien und Reagenzien

Tabelle 14: Analytische Sensitivität LOD und LOQ

Tabelle 15: Präzision Intraassay

Tabelle 16: Präzision Interassay

Tabelle 17: Verdünnungslinearität

Tabelle 18: Korrelation Serum und Plasma

Tabelle 19: Synopsis der Leistungsdaten 1

Tabelle 20: Synopsis der Leistungsdaten 2

Tabelle 21: Zusammenfassung der Leistungsdaten

Tabelle 22: Struktur, Induzierbarkeit, Lokalisation, Funktion und Wirkung von Periostin

9. Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:
Arnold, Aumüller, Austermann, Barth, Baum, Baumann, Bertalanffy, Bien, Cetin, Daut, Donner-Banzhoff, Engenhart-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Garn, Garten, Gemsa, Gres, Grimm, Gudermann, Hegele, Hertel, Höffken, Jungclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Koehler, Koolman, Krieg, Kühnert, Lange, Lill, Löffler, Lohoff, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schu, Seifart, Seitz, Sekundo, Seyberth, Steiniger, Steinkamp, Vogelmeier, Vogt, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wilhelm, Wündisch, Wulf.

9.2 Danksagung

Ich Danke Herrn Professor Dr. Harald Renz für die freundliche Überlassung des Themas, die kompetente Beratung und Unterstützung sowie allen, die mir mit Anregungen und Ratschlägen zur Seite gestanden haben. Darüber hinaus möchte ich insbesondere allen Probanden danken, dass sie ihr Blut für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „**Potentielle Biomarker zur Identifikation des TH2-hoch-Endotyps im Asthma bronchiale“** im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie unter Leitung von Herrn Professor Harald Renz sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in Auszügen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Lauer S, Renz H: The advance of personalized and stratified therapies in bronchial asthma: phenotypes – endotypes - biomarkers, The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2013; Vol 24: n 3-4