

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen der Universität Würzburg**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

**Pilzantigene als spezifische T-Zellaktivatoren
bei der chronischen Rhinosinusitis**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lisa Melanie Sprügel

aus Nürnberg

Würzburg, Oktober 2020

Referent/Referentin: apl. Prof. Dr. med. Stephan Hackenberg

Korreferent/Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2021

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Familie

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	1
1.1.1	T-Zellen	2
1.1.2	Zytokine	3
1.1.3	Superantigene	5
1.2	Die Rhinosinusitis.....	6
1.2.1	Diagnose und konservative Therapie	7
1.2.2	Chirurgische Therapie	8
1.2.3	Prognose	9
1.2.4	Pathophysiologie	9
1.2.5	Staphylococcus aureus (S. aureus).....	12
1.3	Pilze	12
1.3.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> (A. fumigatus)	13
1.3.2	<i>Candida albicans</i> (C. albicans).....	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material	15
2.1	Geräte	15
2.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	16
2.3	Software	20
2.4	Peptidmix	20
3	Methoden	20
3.1	Lymphozytenisolierung aus den Gewebeproben	21
3.2	Isolierung der mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC).	22
3.3	Zellschrottentfernung aus den Lymphozytenproben	23
3.4	Zellsortierung über eine magnetische Separation	24

3.5	Zellzählung.....	26
3.5.1	Zellzählung mit der Neubauer Kammer	26
3.5.2	Zellzählung nach dem Durchflussprinzip	26
3.6	Ansetzen der Zellkultur.....	27
3.7	Positivkontrolle	27
3.8	Auswertung der Zellen an Tag 6	28
3.9	Ki67 ⁺ Expression der Zellen an Tag 6	28
3.10	Durchflusszytometrische TH1/TH2/TH17-Zytokinbestimmung.....	30
3.11	Auswertung und Statistik.....	31
3.11.1	Gating Strategie	31
3.11.2	Auswertung der gemessenen Zytokinkonzentrationen.....	32
3.11.3	Statistische Auswertung	32
3.11.4	Vergleich zwischen PBMC und Gewebe	32
3.11.5	Vergleich mit Negativ- und Positivkontrollen	33
3.11.6	Vergleich von CRScNP, CRSsNP und Kontrollgruppe.....	33
3.12	Graphische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Patienteneigenschaften.....	34
4.2	Vorversuche	35
4.3	Spezifische Aktivierung der T-Zellen.....	35
4.3.1	Spezifische Aktivierung der T-Zellen durch <i>A. fumigatus</i>	35
4.3.2	Spezifische Aktivierung der T-Zellen durch <i>C. albicans</i>	40
4.3.3	Subgruppenanalyse der spezifischen Aktivierung ortständiger T-Zellen	44
4.4	Zytokinexpression der T-Zellen	47
4.4.1	Zytokinexpression nach Kultur mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	47

4.4.2	Zytokinexpression nach Kultur mit <i>Candida albicans</i>	57
4.4.3	Subgruppenanalyse.....	62
5	Diskussion.....	65
5.1	Einführung zur Fragestellung	65
5.1.1	Besiedelung der Nasenschleimhaut mit Fungi.....	66
5.1.2	Klinische Hinweise auf die Mitbeteiligung von Pilzen bei der CRS.....	67
5.1.3	Aktueller Stand der Wissenschaft.....	68
5.2	Diskussion der Methodik	69
5.2.1	Patientenkollektiv.....	69
5.2.2	Gewinnung der Gewebeproben.....	71
5.2.3	Zytokinsekretion.....	72
5.2.4	Kultivierungsmethode	74
5.2.5	Verwendete Antigene	75
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	77
5.3.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> als T-Zellaktivator im Rahmen der CRS.....	77
5.3.2	<i>Candida albicans</i> als T-Zellaktivator im Rahmen der CRS	81
5.4	Fazit und Ausblick	82
5.4.1	Fazit aus den Versuchen mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	82
5.4.2	Fazit aus den Versuchen mit <i>Candida albicans</i>	83
5.4.3	Ausblick	84
6	Zusammenfassung.....	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Abbildungsverzeichnis.....	95
9	Tabellenverzeichnis	98
	Anhang.....	
	Publikation.....	

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFRS	allergic fungal Rhinosinusitis
ALI	Air-Liquid Interface
APC	antigenpräsentierende Zellen
ARS	Akute Rhinosinusitis
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
CRScNP	chronische Rhinosinusitis mit Polypen
CRSsNP	chronische Rhinosinusitis ohne Polypen
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPOS	„european position paper of Rhinosinusitis and nasal polyps“
et al.	Und andere
FACS	fluoreszenzaktiviertes Scannen von Zellen
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
IL	Interleukin
lat.	lateinisch
ml	Mililiter
µl	Mikroliter
mM	mmol/Liter
MPO	Myeloperoxidase
NERD	NSAID-exacerbated respiratory disease
NSAR/NSAID	nichtsteroidalen Antiphlogistika /non steroidal anti-inflammatory drug
PBMC	mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
SE-IgE	IgE Antikörper gegen Staphylococcus aureus Enterotoxin
SN	Signifikanzniveau
SSC	Seitwärtsstreulicht
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Unser Immunsystem besteht aus spezialisierten Geweben und Zellen, deren Aufgabe die Abwehr und Eliminierung von Krankheitserregern ist (Gilles, 2012).

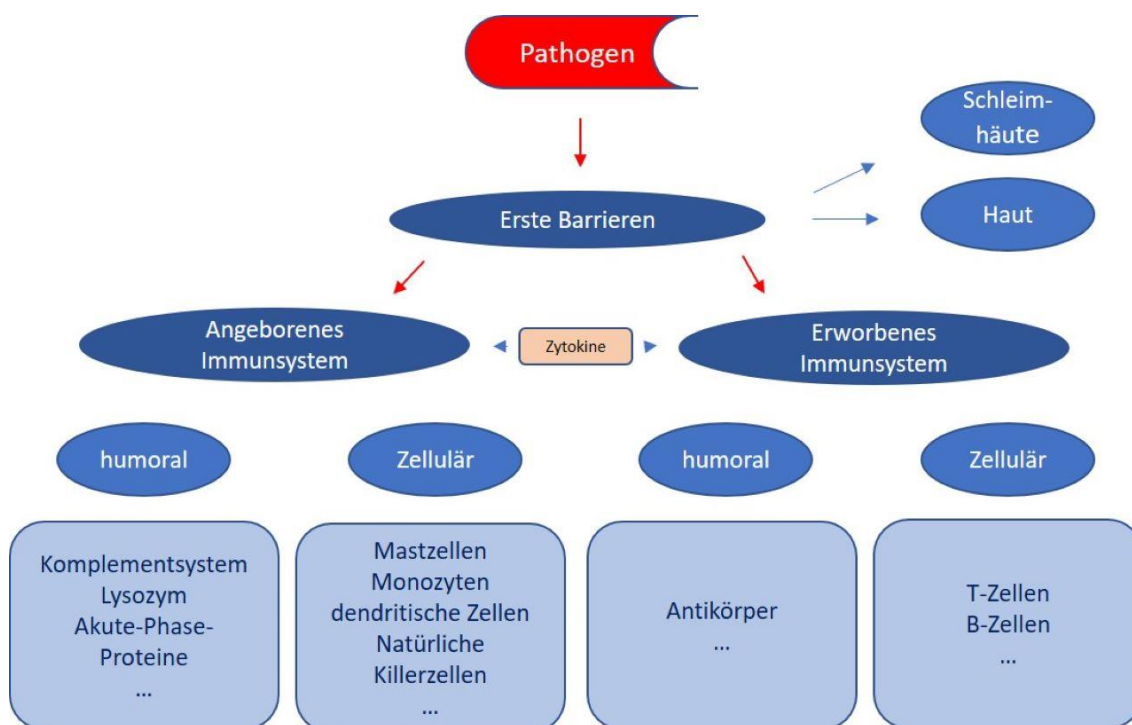


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Immunsystems mit den wichtigsten zellulären und humoralen Bestandteilen

Pathogene kommen ubiquitär in der Umwelt vor, diese können unter anderem Bakterien, Viren oder Pilze sein. Die erste Barriere des menschlichen Körpers für Pathogene bildet die Haut und im Bereich der Atemwege das Epithel der Schleimhäute. Die Mehrzahl an Infektionen beginnt mit dem Eindringen der Krankheitserreger durch die Schleimhäute. Gelingt ihnen das Überschreiten dieser äußeren Barrieren werden die Immunzellen des Körpers aktiviert. Dabei lässt sich die Immunabwehr in die angeborene und die erworbene Abwehr unterteilen. Erst durch das Zusammenspiel der beiden Systeme erfolgt eine geregelte Koordination der Immunantwort. Der Beginn, die Regulierung und das Ende der Abwehrmechanismen werden durch Botenstoffe, sogenannte Zytokine ermöglicht. Sie steuern die Kommunikation, Aktivierung und Hemmung der

Zellen. Zum angeborenen Immunsystem gehören unter anderem die neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen. Diese Zellen werden in ihrer Reaktion von vielen löslichen Faktoren unterstützt, unter anderem den Proteinen des Komplementsystems. Gelingt eine Eliminierung von Pathogenen nicht allein durch das Wirken des angeborenen Systems, kommt es zu einer zusätzlichen Reaktion des erworbenen Immunsystems. Hierzu zählen B- und T-Lymphozyten. Sie koordinieren die Immunantwort und sorgen mit ihrer Gedächtnisfunktion für die Immunität gegenüber bereits bekannten Krankheiten. B-Zellen entstehen im Knochenmark, produzieren Immunglobuline und gehören mit den Makrophagen und den dendritischen Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC). Diese APC sind besonders wichtig, da sie Antigene erkennen, in sich aufnehmen und nach Prozessierung für die T-Zellen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren können (Rink et al., 2012).

1.1.1 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich fast ausschließlich im Thymus und verlassen diesen als naive Zellen. Ihre Aktivierung findet hauptsächlich in lymphatischen Organen statt, ist aber auch in der Nasenschleimhaut möglich. Dafür ist die bereits erwähnte Präsentation der Antigene über die APC erforderlich. Die T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Zum einen gibt es die CD4⁺ T-Zellen. Diese sind verantwortlich für eine Steuerung der Immunantwort und erkennen ihr Antigen über Bindung an MHC-II-Moleküle. CD4⁺ T-Helferzellen lassen sich nun auf Grund ihrer Zytokinsekretion weiter unterteilen in Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen. Die meisten menschlichen CD4⁺-Zellen zeigen ein gemischtes Zytokinprofil und erst nach der Stimulierung durch ein Antigen entwickelt sich ein Th1/Th17 oder Th2 geprägtes Zytokinmuster. Zum anderen gibt es die CD8⁺ T-Zellen, auch zytotoxische bzw. Supressorzellen genannt. Sie erkennen ihre Antigene über Bindung an MHC-I-Moleküle (Klimek et al., 2019). Durch die verschiedenen Zytokinmuster nach Aktivierung der T-Zellen werden bestimmte Zellen des Immunsystems aktiviert und Immunreaktionen dadurch koordiniert (Rink et al., 2012).

1.1.2 Zytokine

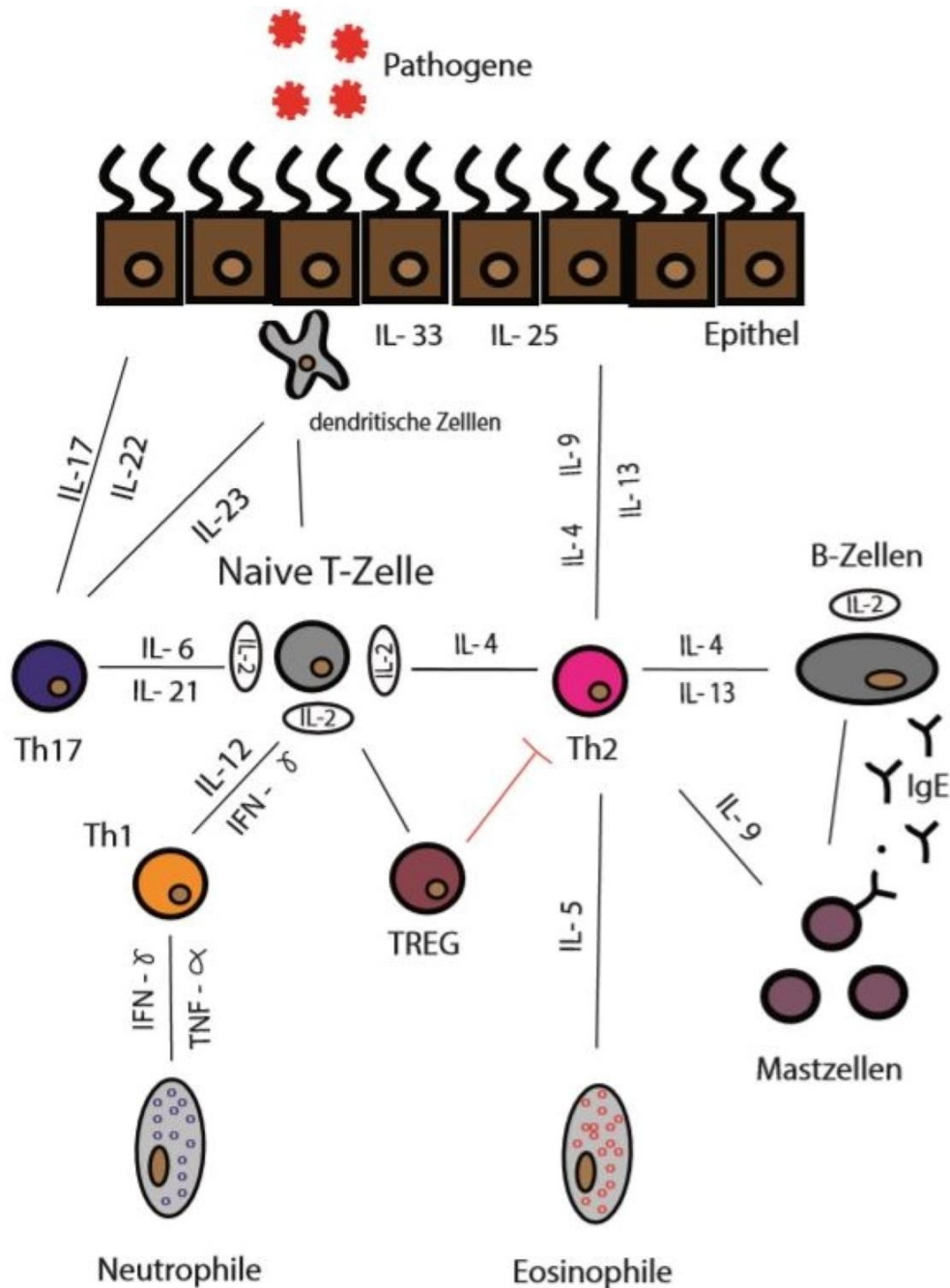


Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten Zytokine der T-Zellen und deren Wirkungsort an Zellen des Immunsystems, modifiziert nach Pellaia et al. (Pellaia et al., 2015)

Zytokine sind körpereigene, meist lösliche Glykoproteine oder Peptide und wirken lokal im Organismus. Durch spezifische Bindung an Rezeptoren modulieren sie die Reaktionen des Körpers und können so entzündungsfördernd oder -hemmend wirken (Feuchtenberger et al., 2007) (Abbildung 2).

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten Zytokine und ihre wichtigsten Funktionen im Organismus

Zytokin	Quelle	Funktion
IL-2	Th1	bewirkt Proliferation der T- und B-Zellen, aktiviert Monozyten (Offermanns, 2012)
TNF- α	Th17/Th1	wirkt inflammatorisch, bewirkt Wachstum und Proliferation vieler Körperzellen (Offermanns, 2012)
IFN- γ	Th1	Antagonist der Differenzierung der Th2-Zellen, Aktivierung und Optimierung der Arbeit der Makrophagen, Aktivierung CD8 ⁺ T-Zellen (Sudowe, 2013), Förderung der Th1-Differenzierung (Rink et al., 2012)
IL-22	Th17/Th1	proinflammatorisch (u.a. IL-6, TNF- α) (Perusina Lanfranca et al., 2016)
IL-21	Th17/Th1	mitverantwortlich für die Differenzierung der Th17 Zellen, reguliert Ig-Produktion, Hemmung der Wirkung regulatorischer T-Zellen (Rink et al., 2012)
IL-17a IL-17f	Th17	Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten (Rink et al., 2012), bewirkt die Bildung von Chemokinen, proinflammatorisch (Offermanns, 2012)
IL-4	Th2	Steigerung der Produktion inflammatorischer Chemokine, bewirkt Antikörperwechsel der B-Lymphozyten auf IgE (Sudowe, 2013), aktiviert Mastzellen (Raulf-Heimsoth and Stock, 2008), Antagonist der Differenzierung der Th1-Zellen (Hemmung INF- γ -Produktion) (Könnecke et al., 2018), wichtig für die Differenzierung der Th2-Zellen (Raulf-Heimsoth and Stock, 2008)

IL-5	Th2	Modulation der Produktion eosinophiler Granulozyten (Sudowe, 2013), Sorgt für Überleben und Aktivierung der durch IL-13 rekrutierten Zellen (Schleimer, 2017)
IL-9	Th2/Th17	Zellaktivator (T- und B-Zellen, Mastzellen und Eosinophile) (Raulf-Heimsoth and Stock, 2008)
IL-10	Th2	Regulierung und Hemmung der Th1/Th2 vermittelten Entzündungsreaktion (Raulf-Heimsoth and Stock, 2008)
IL-13	Th2	Antiinflammatorische Wirkung (Rink et al., 2012), aktiviert die Expression von Molekülen, die Lymphozyten, Mastzellen, Basophile und Eosinophile rekrutieren, wichtig für die Differenzierung von Monozyten (Schleimer, 2017)
IL-6	Th17	Hemmung der Rekrutierung Neutrophiler (Könnecke et al., 2018), zusammen mit TGF- β wichtig bei der Differenzierung der Th17-Zellen (Sudowe, 2013)

Th1-Zellen kommen vorwiegend bei der Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen zum Einsatz und benötigen für ihre Differenzierung IL-12. Die Abwehr von Parasiten läuft hauptsächlich über die Vermittlung des Th2-Musters. Um extrazelluläre Bakterien zu bekämpfen sind die Zytokine des Th17-Musters besonders wichtig. (Sudowe, 2013)

1.1.3 Superantigene

Manche Toxine können zu einer starken Aktivierung von Subpopulationen von T-Zellen führen und werden als Superantigene bezeichnet (Schütt and Bröker, 2011). Diese Superantigene können eine polyklonale T-Zellaktivierung bewirken, indem sie das MHC-II Molekül der antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit dem T-Zellrezeptor der T-Zellen ohne vorangegangene Prozessierung verbinden.

Diese Aktivierung geschieht unabhängig von der Antigenspezifität der T-Zelle (Kaufmann, 2009). Gefährlich können Superantigene vor allem in großen Mengen werden, dabei kann es zu einer starken Aktivierung der T-Zellen und Ausschüttung großer Mengen an Zytokinen kommen (toxisches Schocksyndrom (TSS)) (Schütt and Bröker, 2011). Bakterien- und Pilzproteine können ebenfalls als Superantigene starken Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen haben. Sie können dabei mit einer hohen Anzahl an Krankheiten in Verbindung gebracht werden (u.a. Diabetes mellitus, Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis) (Rink et al., 2012).

1.2 Die Rhinosinusitis

Die Rhinosinusitis kann für die betroffenen Patienten in ihrem Leben stark einschränkend sein und stellt deswegen eine starke Belastung im Alltag dar. Es handelt sich um eine Entzündung der Nase und Nasennebenhöhlen mit zwei oder mehr Symptomen. Eines dieser Symptome stellt sich als nasale Verstopfung/Verengung/Stau oder Rhinorrhöe dar. Zusätzlich kann fakultativ ein Druckschmerz im Bereich des Gesichts oder eine Geruchseinschränkung dazu kommen. Ergänzend zeigen sich entweder im CT Schleimhautveränderungen im Bereich der Nasenschleimhaut oder endoskopisch Polypen/mukopurulenter Ausfluss/Ödeme. Insgesamt lassen sich bei der Rhinosinusitis drei verschiedene Formen unterscheiden: 1) die akute Rhinosinusitis (ARS), bei der die Symptome unter 12 Wochen anhalten, 2) die akut rezidivierende Rhinosinusitis (rez. ARS), bei der es zu maximal 4 akuten Krankheitsverläufen im Jahr kommt, diese werden abgelöst durch Phasen absoluter Symptomfreiheit und 3) die chronische Rhinosinusitis (CRS), bei deren Auftreten die Betroffenen mit Symptomen in Phasen über zwölf Wochen im Jahr konfrontiert werden (Fokkens et al., 2020).

In vielen Teilen der Welt ist die Rhinosinusitis eine häufige Erkrankung. In ihrer Epidemiologie weist sie jedoch starke globale und zeitliche Schwankungen auf. Die Datenlage über die Prävalenz und Inzidenz der Rhinosinusitis ist begrenzt und zusätzlich sind die Ergebnisse unter den einzelnen Studien auf Grund der unterschiedlich angesetzten Maßstäbe schwer vergleichbar (Beule, 2015). In Europa wurde hierbei die Prävalenz der chronischen Rhinosinusitis (CRS) von

10,9 % der Bevölkerung ermittelt (Hastan et al., 2011). Sozioökonomisch stellt die CRS weltweit eine starke Belastung für das Gesundheitssystem dar. In Deutschland ist es schwierig genaue Kosten für die Krankheit zu ermitteln. In amerikanischen Studien wird die Prävalenz der Krankheit auf 4,9% geschätzt und die jährlichen Kosten für das amerikanische Gesundheitssystem betragen ca. 8,6 Milliarden US-Dollar (Bhattacharyya, 2011).

Die chronische Rhinosinusitis ist ein komplexes Krankheitsbild mit mehreren Varianten. Nach dem Phänotyp kann man klassisch zwei Formen unterscheiden (Fokkens et al., 2020): Lassen sich in einer Rhinoskopie, Endoskopie oder einem bildgebenden Verfahren Polypen im Bereich der Nasenhaupthöhle nachweisen, spricht man von einer Rhinosinusitis mit (lat. cum) Polypen (CRScNP). Ist dies nicht möglich, handelt es sich um die chronische Rhinosinusitis ohne (lat. sine) Polypen (CRSsNP) (Stuck et al., 2018). Neuere Einteilungen orientieren sich bei der Klassifikation der CRS am vorherrschenden Entzündungsprofil in sogenannte Endotypen (Tomassen et al., 2016). Asthma und CRS treten dabei häufig zusammen auf, vor allem bei Patienten mit einer Analgetikaintoleranz (Stuck et al., 2018). Hierbei wird das gleichzeitige Vorkommen von CRScNP, Asthma bronchiale und Intoleranz gegenüber nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) als NERD (NSAID-exacerbated respiratory disease) oder Samter Trias bezeichnet (Rodriguez-Jimenez et al., 2018).

1.2.1 Diagnose und konservative Therapie

Die Grundlage der Diagnose bildet die Anamnese der Patienten, hierbei sollten bereits wichtige Informationen bezüglich der Symptome, des Verlaufs der Krankheit, bereits erfolgter Behandlungen und Vorerkrankungen abgeklärt werden, um eine gezielte Therapie zu ermöglichen.

1.2.1.1 Akute und akut rezidivierende Rhinosinusitis

Die Diagnose der akuten Form geschieht auf Grundlage der klinischen Befunde. Bei der akut rezidivierenden Form wird hierfür eine Endoskopie oder mindestens eine Rhinoskopie empfohlen. Auch ohne eine Therapie kommt es bei 90 % der an ARS erkrankten Patienten innerhalb von 6 Wochen zu einer vollständigen

Genesung (Stuck et al., 2018). Eine Linderung der Symptome kann dennoch durch Nasenspülungen, Inhalation heißer Dämpfe, Anwendung bestimmter Extrakte (z.B. Eukalyptus) und Analgetika bewirkt werden. Bei allergischer oder rezidivierender ARS finden Kortikoidsprays Anwendung. In schweren Fällen, bei bestehenden Vorerkrankungen oder drohenden Nebenwirkungen (hohen Entzündungswerten oder bestimmten Keimnachweisen), können zusätzlich Antibiotika angewendet werden (Stuck et al., 2018).

1.2.1.2 Chronische Rhinosinusitis

Die Diagnosestellung sollte sowohl bei der CRSsNP als auch der CRScNP nur in Verbindung mit einer endoskopischen Untersuchung erfolgen. Eine zusätzliche Schnittbildgebung wäre vorteilhaft. Im Falle einer Operation sollte zudem ein CT oder mindestens ein DVT angefertigt werden. (Stuck et al., 2018).

Ein Abschwellen der Nasenschleimhaut, eine erhöhte mukoziliäre Clearance und eine Verbesserung der Lebensqualität kann durch Anwendung von Nasenspülungen mit Salzlösungen bewirkt werden. Topische Glucokortikosteroide gehören bei beiden Formen der CRS zur Standardtherapie. Eine systemische Anwendung sollte nur bei CRScNP in Betracht gezogen werden. Bei Versagen der Standardtherapie kann bei CRSsNP auf eine Langzeiteinnahme von Clarithromycin zurückgegriffen werden, bei Rezidiven der CRScNP auf die längere Einnahme von Doxycyclin (Stuck et al., 2018).

1.2.2 Chirurgische Therapie

Operationen der Rhinosinusitis finden hauptsächlich bei der rezidivierenden oder chronischen Form Anwendung. Indiziert ist eine Operation bei einem Versagen der adäquat durchgeführten konservativen Therapie (Stuck et al., 2018). Die Ziele sind dabei, in der Operation Gewebeanteile mit besonders entzündungsaktiven Zellen oder irreversibel erkrankter Schleimhaut zu entfernen, Voraussetzungen für eine entzündungshemmende Therapie zu schaffen und dabei eine bestmögliche Wiederherstellung von Ventilation und Drainage zu bewirken (Weber, 2015).

1.2.3 Prognose

Durch die oben genannten Therapieansätze kann die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert werden (van der Veen et al., 2017). Das Ziel einer Behandlung soll dabei sein, eine andauernde Kontrolle über die Krankheit zu bekommen, so dass die Patienten keine Symptome mehr zeigen oder ihre Lebensqualität durch sie zumindest nicht negativ beeinflusst wird (Fokkens et al., 2020). Bereits in dem „European position paper of rhinosinusitis and nasal polyps“ (EPOS) 2012 wurde für CRS-Patienten nach der Behandlung eine Einteilung in drei Kategorien vorgenommen (kontrollierte, teilweise kontrollierte und unkontrollierte Erkrankung). Eine Rolle spielten dabei klinische Symptome, endoskopische Ergebnisse (falls vorhanden) und ob der Einsatz von systemischen Medikamenten zur Kontrolle notwendig war (Fokkens et al., 2012a). Eine Studie in Belgien untersuchte unter Berücksichtigung dieser Kriterien Patienten mit CRS (sowohl CRScNP, als auch CRSsNP), die 3-5 Jahre zuvor konservativ und operativ behandelt wurden. Das Ergebnis war eine Einteilung in 19,5 % kontrollierte, 36,8 % teilweise kontrollierte und 43,7 % unkontrollierte Fälle (van der Veen et al., 2017). Auf Grund der hohen Anzahl unkontrollierter Fälle in dieser und weiterer Studien wurde die Einteilung in dem EPOS 2020 verschärft. Studien mit den neuen Kriterien stehen jedoch noch aus (Fokkens et al., 2020). Auch wenn bisher nur die Studienlage mit den Kriterien aus EPOS 2012 berücksichtigt werden kann, wurde dadurch bereits gezeigt, dass es viele Patienten gibt, die trotz langfristiger konservativer und chirurgischer Behandlung unter einem Persistieren von Beschwerden leiden (van der Veen et al., 2017).

1.2.4 Pathophysiologie

Meist wird bei der CRScNP eine eosinophile, Th2 -vermittelte Entzündung gefunden (mit hohem IL-4, IL-5 und IL-13 Spiegel) und bei CRSsNP ein gemischtes Profil aus Th1/Th17- und Th2-vermittelter Entzündung (Könnecke et al., 2018). Doch diese Unterscheidung erfasst nicht die molekular existierende Vielfalt der Pathophysiologie (Tomassen et al., 2016). Zudem wurden starke globale Unterschiede festgestellt. In einer internationalen Studie konnte bei den

Patienten mit CRScNP aus Deutschland und den Beneluxländern ein Th2-basiertes Entzündungsprofil festgestellt werden, wobei in China (Beijing und Chengdu) ein gemischtes Th1/Th17/Th2- oder sogar niedrigeres Th2-Entzündungsmuster nachgewiesen werden konnten (Wang et al., 2016).

Deswegen wurde 2016 von Tomassen et al. ein neuer, phänotypfreier Ansatz verfolgt. Hierbei wurde Gewebe aus Operationen von Patienten mit CRS und gesunden Patienten auf Immunmarker untersucht, nach der Messung erfolgte eine Einteilung in Cluster. Gemessen wurden die Marker IL-5, IFN- γ , IL-17a, TNF- α , IL-22, IL-1 β , IL-6, IL-8, eosinophiles kationisches Protein (ECP), Myeloperoxidase (MPO), TGF- β 1, IgE, Staphylococcus aureus enterotoxin-spezifisches IgE (SE-IgE) und Albumin (Tabelle 2) (Tomassen et al., 2016).

Tabelle 2: gemessene Biomarker und deren funktionelle Einteilung in Gruppen (Tomassen et al., 2016)

Gruppe	Gemessene Marker
Eosinophile, Th2-bezogene Biomarker, Antikörperproduktion und Albumin	ECP, IL-5, IgE, SE-IgE + Albumin
Neutrophile und proinflammatorische Zytokine	IL-1 β , IL-6, IL-8, und MPO
Th17/Th22 bezogene Biomarker	IL-17a, IL-22, TNF- α
Th1 bezogene Biomarker	IFN- γ
TGF-Gruppe	TGF- β 1

Diese wurden anhand ihrer gemessenen Konzentration mit klinischen Diagnosen wie den Phänotypen und Comorbiditäten abgeglichen. Es zeigte sich, dass innerhalb der CRS keine homogene Entzündung vorlag, sondern Endotypen mit einer großen Vielfalt an Entzündungsprofilen existierten (Tomassen et al., 2016).

Bei der abschließenden Einteilung in 10 Cluster anhand der Höhe der Konzentration dieser speziellen Marker ergaben sich 4 Cluster mit niedrigen Konzentrationen an IL-5 und 6 Cluster mit höheren Konzentrationen von IL-5. Von den 4 niedrigen Clustern bestanden 3 hauptsächlich aus Patienten mit CRSsNP, einer Prävalenz zu Asthma und bei einem Cluster zeigte sich ein gemischtes CRSsNP/CRScNP-Profil. Bei den 6 Clustern mit höheren

Konzentrationen konnte man in moderate Konzentrationen (eine gemischte CRScNP/CRSsNP-Gruppe mit erhöhter Asthmaprävalenz) und hohe Konzentrationen mit fast ausschließlich Patienten mit CRScNP und stark erhöhter Asthmaprävalenz unterteilen.

Bei der Gruppe mit vielen CRScNP-Patienten konnten 2 Cluster identifiziert werden, die insgesamt die höchste Konzentration an IgE und höchste Asthmaprävalenz enthielten, dabei konnte bei allen die Expression von IgE-Antikörpern gegen S. aureus Enterotoxin (SE-IgE) nachgewiesen werden (Abbildung 3) (Tomassen et al., 2016).

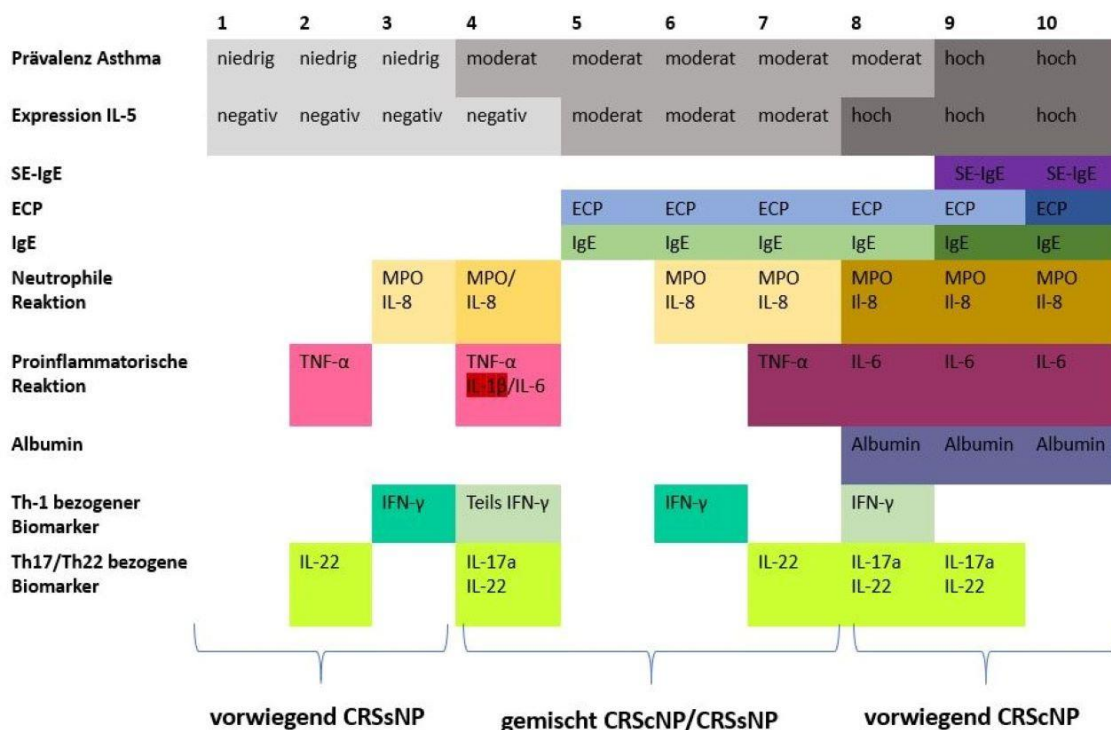


Abbildung 3: Übersicht über die 10 Cluster, die gemessenen Zytokine, die Phänotypen und die Komorbidität mit Asthma bronchiale, modifiziert nach Tomassen et al. (Tomassen et al., 2016)

Besonders relevante Marker waren IL-5, ECP, IgE und Albumin. IL-5 zeigte sich hierbei als Hauptfaktor für die Bestimmung des Phänotyps und der Komorbidität mit Asthma bronchiale. Hohe Werte an SE-IgE waren mit Patienten mit CRScNP, eosinophiler Entzündung, gesteigerten IgE-Werten und dem Vorkommen von Asthma verbunden. Auf Grund dieser Ergebnisse könnten inflammatorische Endotypen in Zukunft für die Prognose der Entwicklung von komorbidem Asthma

und Rezidiven der CRS nach operativer Therapie wichtig sein (Tomassen et al., 2016).

1.2.5 Staphylococcus aureus (S. aureus)

S. aureus besiedelt dauerhaft Haut und Nase von 20-30 % der menschlichen Bevölkerung (Kim et al., 2012). Eine deutlich stärkere Besiedelung von über 60 % konnte in der Nasenschleimhaut von Patienten mit CRScNP festgestellt werden (Van Zele et al., 2004). Das Bakterium bildet Enterotoxine, die als Superantigene eine starke Wirkung auf T-Zellen haben können (Bachert et al., 2003). Die, in Folge dessen, vom Körper gebildeten Antikörper zeigen sich bei den CRScNP Patienten erhöht (Bernstein et al., 2011). Diese korrelieren mit der ausgelösten eosinophil geprägten Entzündung, der Existenz sowie der Schwere der Komorbidität mit Asthma bronchiale und dem Vorhandensein von einer NSAR-Intoleranz (Bachert et al., 2001, Bachert et al., 2003). Die Rolle bei *S. aureus* ist bei der CRScNP bereits bekannt und die Antikörper gegen seine Enterotoxine wurden bereits bei der Einteilung der Endotypen mit einbezogen (Tomassen et al., 2016).

1.3 Pilze

Man kann in der Schleimhaut der Nase und der Nasennebenhöhlen bei annähernd jedem Individuum, eingeschlossen auch alle CRS Patienten, Pilze identifizieren (Ebbens and Fokkens, 2008). So können bei über 90 % der Patienten mit CRS im Nasensekret Pilze nachgewiesen werden. (Braun et al., 2003) (Ponikau et al., 1999).

Die Pilzsporen können über die Atemwege aufgenommen werden und lagern sich dort auf der Mukosa ab. Bei gesunden Patienten zeigen sie sich meist nicht als Pathogene, dennoch können sie unter bestimmten Umständen Krankheiten verursachen (Ebbens and Fokkens, 2008).

Aspergillus fumigatus, als Vertreter der Schimmelform, ist derzeit das wichtigste Pilzpathogen in der Luft, er kann beim Menschen verschiedene Krankheiten auslösen, eine davon ist die invasive Aspergillose (McCormick et al., 2010). Sensitivität gegen *A. fumigatus* wurde zudem mit schwerem persistierendem

Asthma in Verbindung gebracht (Ghosh et al., 2015). *Candida albicans*, als Vertreter der Hefeform, ist ein einzigartiger Parasit, der in der Lage ist, Schleimhautoberflächen zu besiedeln, zu infizieren, dort zu persistieren und die Schleimhaut zu einer Immunantwort zu stimulieren (Romani, 2000).

Sowohl *A. fumigatus* als auch *C. albicans* gehören zu den opportunistischen Pathogenen (McCormick et al., 2010, Biswas et al., 2007). Sie finden sich häufig in der Schleimhaut von gesunden Patienten und überleben durch ihr Anpassen an verschiedene Umwelteinflüsse im Wirt. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie bestimmte Umstände, wie eine Immunschwäche, Nährstoffmangel, bestimmte Erkrankungen oder mechanische Verletzungen im Menschen ausnutzen können und in diesem Fall als Pathogene wirken (Biswas et al., 2007).

Deswegen könnten sie auch bei der Aufrechterhaltung der Entzündung bei der CRS eine Rolle spielen. Der genaue Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen durch *C. albicans* und *A. fumigatus* ist bislang nicht abschließend geklärt.

1.3.1 *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)

Insgesamt gibt es über 200 identifizierte Aspergillusarten, weniger als 20 davon können bekanntermaßen als Verursacher von Krankheiten fungieren. Einer davon und gleichzeitig die am weitesten verbreitete Art ist *Aspergillus fumigatus* (Dagenais and Keller, 2009).

Die von ihm gebildeten und vom Menschen leicht eingeatmeten Sporen sind bei gesunden Patienten meist nicht von Bedeutung. Sie werden durch das Immunsystem bekämpft und unbemerkt beseitigt. Eine Erkrankung des Wirts kann allerdings dann auftreten, wenn die Reaktion auf den Pilz zu schwach oder zu stark ausgeprägt ist (Hohl and Feldmesser, 2007).

Schätzungen zufolge atmet ein Mensch pro Tag durchschnittlich bis zu 200 Sporen ein (Dagenais and Keller, 2009). Die Sporen haben dabei eine Größe von ca. 2,5 - 3,0 μm , bei ihrem Wachstum stellen sie keine hohen Ansprüche an ihre Umwelt und sind sehr temperaturtolerant (Brakhage and Langfelder, 2002). In einer amerikanischen Studie konnte im Nasensekret von über 30 % der CRS

Patienten ein Nachweis über *A. fumigatus* erbracht werden. Im Vergleich wurde die Besiedelung bei gesunden Probanden nur bei 13 % festgestellt (Braun et al., 2003).

1.3.2 *Candida albicans* (*C. albicans*)

C. albicans ist ein Pilz, den man in der Flora des Gastrointestinaltraktes der meisten gesunden Menschen finden kann. Unter speziellen veränderten Bedingungen kann er allerdings zu einem lebensbedrohlichen Pathogen werden. Häufig ist dies verbunden mit einer morphologischen Veränderung der einzelligen Hefeform in eine filamentöse Form. Dabei können Mangelernährung, Immunschwächung oder mechanische Verletzungen dazu führen, die mikrobielle Flora zu verändern und eine Übernahme durch *C. albicans* zu ermöglichen. Insgesamt zeigt *C. albicans* eine erstaunliche Anpassungsfähigkeit an extreme Umweltbedingungen (Biswas et al., 2007). In einer amerikanischen Studie konnte im Nasensekret von CRS Patienten bei 6,5 % ein Nachweis von *C. albicans* erfolgen (Braun et al., 2003). Interessant erscheint dabei, dass sich in chinesischen Studien unter gleichen Bedingungen ein deutlich höherer Prozentsatz ermitteln ließ (Jiang et al., 2005).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Vor allem für die verschiedenen Formen der CRS fehlt bisher eine tiefgreifende immunologische Typisierung der Phänotypen. Hierbei ist vor allem die Pathophysiologie bisher noch nicht endgültig geklärt (Stuck et al., 2018). Dabei könnte die Produktion verschiedener Zytokine eine große Rolle spielen (Stuck et al., 2007). Von besonderem Interesse erscheint die Aufrechterhaltung der lokalen Entzündungsreaktion durch verstärkte Aktivierung lokaler Immunzellen. Hierbei sollte in vorliegender Arbeit der Einfluss von *A. fumigatus* und *C. albicans* auf die Pathophysiologie der CRS untersucht werden. Für diese Fragestellung erfolgte die *in vitro* Stimulierung von peripheren und lokalen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Patienten mit CRScNP, CRSsNP und gesunden Patienten mit den beiden Antigenen über 6 Tage.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Brutschrank Modell 220 CB 220 (E6.1)	Binder, Tuttlingen (Deutschland)
Casy® Modell TT Cell Counter	Innovatis AG, Reutlingen (Deutschland)
Dampfsterilisator Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg (Deutschland)
DynaMag™-Spin	Life technologies Corp. By Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
FACS Canto Model BD Flow Cytometer™	BD Biosciences, San Jose (USA)
Flow Cytometer LSR II	BD Biosciences, San Jose (USA)
Gefriertruhe (Ultra Low Temperature freezer-80 C760)	New Brunswick Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Gentle MACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Kühlschrank (7082821-00)	Liebherr Hausgeräte, Radinovo (Bulgarien)
ICA Combimag RCO	Janke und Kunkel GmbH und Co., Staufen im Breisgau (Deutschland)
MACS Magnet	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Magnetfeld MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)

Mikroskop	Carl Zeiss Axiolab, Jena (Deutschland)
Multichannel Transferpipette	Brand, Wertheim (Deutschland)
Neubaur Zählkammer	Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön (Deutschland)
Shaker DOS 20 S	NeoLab, Heidelberg (Deutschland)
Sicherheitswerkbank Hera Safe KS18	Thermo Scientific LED GmbH, Langenselbold (Deutschland)
Stickstofftank	Air liquid division materiel cryogenique, 77607 (Frankreich)
ZX advanced vortex mixer (F202A0280)	VELP Scientifica, Usmate (Italien)
Wasserbad WNB 7-45	Memmert, Schwabach (Deutschland)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: verwendete Materialien

Material	Hersteller, Ort
BDTM Cellwash	BD Biosciences, San Jose (USA)
Biocoll Separation Solution	Biochrom GmbH, Berlin (Deutschland)
BSA Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe (Deutschland)
Casy Cups	Omni Life Science GmbH + Co KG, Bremen (Deutschland)
Casyton	Omni Life Science GmbH + Co KG, Bremen (Deutschland)

Cell culture dishes	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Cellstar tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Cryovials	Simport, Beloeil (Kanada)
Debris Removal Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
DMSO Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe (Deutschland)
Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28	Gibco by Thermo Fisher Scientific Caltics UAB, Vilnius (Litauen)
Easy Strainer	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich Productions GmbH, Steinheim (Deutschland)
Einwegpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Factor Staining Buffer Set, Kit	Life technologies Corp. By Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
FCS (Bovine Serum fetale)	Linaris blue, Wertheim (Deutschland)
Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG und Co. KG, Nürnbrecht (Deutschland)
Flow Cytometer Tubes 5 mL	Sarstedt AG und Co. KG, Nürnbrecht (Deutschland)
Gentle MACS™ C-Tubes	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Human Tissue Dissociation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)

Human IL-2 Premium Grade	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Legendplex™ Human Cytokin Panel (13-plex)	Biolegend, San Diego (USA)
Leukosep Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Zellkulturplatte 96 Well, ultra low Cluster Round Bottom	Kennebunk (USA)
MS MACS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Microbeads human CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Mouse IgG	Sigma-Aldrich Productions GmbH, Steinheim (Deutschland)
Pasteurre Pipetten	Brand, Wertheim (Deutschland)
Peptivator <i>A. Fumigatus</i> pmp20 research grade	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Peptivator <i>C. Albicans</i> MP65 research grade	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Premixed PBS Puffer 10x 1:10	Roche Disagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
Purified anti-human CD3 Antibody	Biolegend, San Diego (USA)
Reagent Reservoir Low residual Volume 10 mL	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
RPMI 1640 Medium	Biochrom GmbH, Berlin (Deutschland)
Safe Seal Reagiergefäße	Sarstedt AG und Co. KG, Nürnbrecht (Deutschland)

S-Monovette	Sarstedt AG und Co KG, Nürnbergrecht (Deutschland)
T Cell Activation/Expansion Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
TexMACS Medium (1%Pen/Strep)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Trypanblue Solution 0,4%	Sigma Aldrich Productions GmbH, Steinheim (Deutschland)

Tabelle 5: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller, Ort
Human CD45 Pacific Orange Conjugate	Life Technologies Corp, Frederick (USA)
Invitrogen eBioscience™ Fixable Viability DyeFluor™ 780	Life Technologies Corp., Carlsbad (USA)
PE/Cy7 antihuman CD3 Antikörper	Biolegend, London (UK)
Pacific Blue™ anti-human CD4	Biolegend, London (UK)
Alexa Fluor® 700 anti-human CD8a	Biolegend, London (UK)
PE Mouse anti-human Ki67-Set	BD Biosciences, San Jose (USA)

2.3 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Hersteller, Ort
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Washington (USA)
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Washington (USA)
Graph Pad Prism	Graph Pad Softwar Inc., San Diego (USA)
Single Cell Analysis Software Flow Jo v10	BD Bioscience, San Jose
Legendplex Software v 8.0	Treestar Inc, Ashland (USA)
FACS Diva Software	BD Bioscience, San Jose (USA)
Adobe Illustrator	Adobe Inc., San Jose (USA)

2.4 Peptidmix

Als Antigene für die Versuche wurden die Peptidmixe „PepTivator *C. albicans* MP65 research grade“ und „Peptivator *A. fumigatus* pmp20 research grade“ von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet.

Generell sind die genauen Herstellungsmethoden geheim. Jedoch gibt der Hersteller an, dass jede hergestellte Charge nach einem Standardprotokoll produziert und anschließend gegen ein Referenzlot getestet wird. Diese Peptidmixe können deswegen als Standardreagenz zum Nachweis pilzspezifischer T-Zellen verwendet werden.

3 Methoden

Für die Versuche wurden Gewebe- und Blutproben von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis mit Polypen (CRScNP), mit chronischer Rhinosinusitis ohne

Polypen (CRSsNP), sowie als Kontrollgruppe Nasenschleimhaut von gesunden Probanden verwendet. Zudem wurde jedem der Patienten 19 ml Vollblut durch Punktion einer peripheren Vene abgenommen. Sowohl aus dem Gewebe als auch aus dem peripheren Blut wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen isoliert. Diese wurden über 6 Tage jeweils mit einem Antigen von *Aspergillus fumigatus* bzw. *Candida albicans* in einer Konzentration von 1 µg/ml kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Messung der produzierten Zytokinkonzentration sowie die Aktivität der T-Zellen über die Expression des Proliferationsmarkers Ki67.

Die humanen T-Zellen wurden von Patienten gewonnen, die sich einem operativen Eingriff an den Nasennebenhöhlen in der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen in Würzburg unterziehen mussten. Alle Patienten wurden präoperativ aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben. Insgesamt wurden in dieser Arbeit zehn Proben der CRScNP Gruppe, acht Proben der CRSsNP sowie neun Proben von gesunden Patienten verwertet. Die intraoperativ gewonnenen Gewebeproben wurden in 5 ml gekühlter (5° C) Kochsalzlösung überführt und zusammen mit den Blutproben zur weiteren Verarbeitung am selben Tag in unser Labor gebracht. Ein Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg (Nummer AZ-12/06) liegt zu allen im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen sowie der Gewinnung und Verarbeitung der Gewebe- und Blutproben vor.

3.1 Lymphozytenisolierung aus den Gewebeproben

Der darauffolgende Prozess wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Gewebeproben wurden mithilfe des Multi Tissue Dissociation Kits und dem Gentle MACS Dissoziator von Miltenyi verarbeitet. Dafür wurden sie gewogen, in Gewebewürfel der Kantenlänge von 2-4 mm geteilt und in C-Tubes überführt, wobei maximal 1 Gramm pro Röhrchen verteilt wurde. Die Tubes wurden zuvor für den Empfang des Gewebes vorbereitet und pro 0,5 Gramm Gewebe mit 2,35 ml serumfreiem RPMI 1640, 100 µl Enzym D, 50 µl Enzym R und 12,5 µl Enzym A befüllt. Die Röhrchen wurden verschlossen und auf den Dissoziator aufgesetzt. Unter dem Programm Multi A wurde die Probe

verarbeitet. Die Zeit auf dem Gerät betrug dabei 41 Minuten und 10 Sekunden und die Anzahl an durchlaufenen Umdrehungen belief sich auf 1332. Nach Beendigung des Programms wurde die nun erhaltene Zellsuspension nacheinander durch Zellsiebe der Durchlässigkeit 100 µm, 70 µm und 40 µm gefiltert, die C-Tubes dabei mit 15 ml RPMI Medium gespült und der Durchfluss in einem Cellstar Röhrchen bei 300 x Erdbeschleunigung (g), niedrigster Bremse und Beschleunigungsgrad (= Stufe 1 entspricht einer Beschleunigung von 200 rpm) sieben Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in zuvor angesetztem Einfriermedium, bestehend aus 90% fetalem Kälberserum und 10% Dimethylsulfoxid, aufgelöst und bei -80 °C eingefroren. Dabei musste dafür gesorgt werden, dass die Zellen langsam die Temperatur annahmen (durch schonendes Absenken der Temperatur um 1°C in jeder zweiten Minute). Spätestens 48 Stunden später wurden die Zellen in Stickstoff auf -195°C überführt.

3.2 Isolierung der mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Das Blut der Patienten wurde intraoperativ durch Punktion einer peripheren Vene gewonnen und in ein Heparinröhrchen abgefüllt. Die Gewinnung der PBMC erfolgte durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten. Dazu wurden 16 ml Biocoll-Lösung in ein Leucosep Röhrchen gefüllt und dieses eine Minute bei 1000 x g, mittlerer Beschleunigung und mittlerer Bremse (Stufe 5) zentrifugiert, so dass sich das Separationsmedium nun unterhalb der im Röhrchen liegenden Trennscheibe befand. Die 18 ml Blut wurden währenddessen mit 10 ml steriler Kochsalzlösung vermischt und danach vorsichtig in den oberhalb der Trennscheibe liegenden Bereich des Röhrchens eingefüllt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation des Leukosep Röhrchens bei 1000 x g, mittlerer

Beschleunigung und ausgestellter Bremse, um eine Phasenbildung hervorzurufen (Abbildung 4).

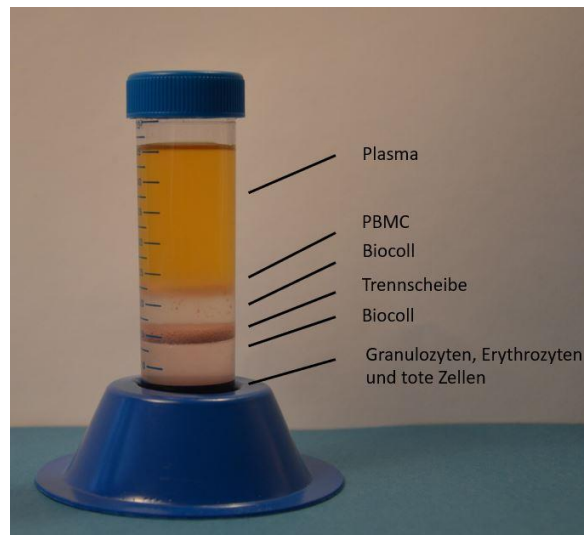


Abbildung 4: Phasentrennung Vollblut in Leukosep Röhrenchen

Erythrozyten sowie tote Zellen sammelten sich auf Grund ihrer Dichte nun unter der Trennscheibe. Das sich nun zuoberst befindliche Plasma wurde bis auf eine Höhe von 5-10 mm durch eine Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Danach wurde die angereicherte Zellfraktion geerntet, in einem separaten Röhrenchen mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) vermischt und bei mittlerer Bremse und mittlerer Beschleunigung zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde dieser Waschvorgang mit 5 ml Salzlösung zweifach wiederholt, der Überschuss erneut verworfen und die Zellen, in 1 ml Einfriermedium gelöst, eingefroren.

3.3 Zellschrottentfernung aus den Lymphozytenproben

An Tag 1 des Versuchs wurde zunächst eine Zellschrottentfernung mit dem Debris Removal Kit von Miltenyi durchgeführt. Hierfür wurden die gesammelten Proben des jeweiligen Patienten in den Einfrierröhrenchen in ein Wärmebad bei 37 °C gelegt, dabei wurde gerade so lange gewartet bis das Eis komplett auftaute. Nach der Desinfektion des Röhrenchens überführte man den gesamten Inhalt zügig

von den Einfrierröhrchen (1ml) in ein 15 ml Röhrchen und zentrifugierte bei 1400 Umdrehungen pro Minute (rpm) fünf Minuten bei 4 °C und mittlerer Bremse ohne Zugabe einer Lösung. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der vorgeschriebenen Menge an kalter PBS resuspendiert. Dies entspricht bei < 0,5 Gramm Zellen 3100 µl Flüssigkeit. Die Zellsuspension der Gewebeproben wurden daraufhin durch einen 40 µl Filter gesiebt und die entsprechende Menge an Debris Removal Solution (i.d.R. 900 µl) vorsichtig hinzugefügt. Durch zehnmaliges leichtes auf- und abwärtspipettieren mit einer 5ml-Pipette erfolgte eine Durchmischung der Probe und anschließend wurden 4 ml PBS aufgelagert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1400 rpm unter 4 °C mit voller Beschleunigung und voller Bremse konnte man die obersten zwei Phasen entfernen, sodass im Röhrchen die Zellfraktion verblieb. Um ein Endvolumen von 15 ml zu erreichen gab man bei <0,5g Gewebe vorsichtig 7ml PBS zu, vermischte die Probe durch dreimaliges Drehen und zentrifugierte bei 1000 x g bei 4 °C, mittlerer Beschleunigung und mittlerer Bremse. Der Überschuss wurde erneut entfernt und die gereinigte Zellfraktion in dem Isolierungspuffer aufgelöst (PBS, 0,5 % bovines Serumalbumin (BSA), 2 mmol/Liter (mM) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)), um im Anschluss daran eine Zellzahlmessung im Durchflussprinzip durchzuführen.

3.4 Zellsortierung über eine magnetische Separation

Nach der Zellschrottentfernung erfolgte sowohl aus den PBMC als auch aus den Lymphozyten aus dem Gewebe eine positive Selektion der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, sowie im Anschluss eine negative Selektion der CD3⁺ Zellen. Der komplette Ablauf wurde unter Kühlung der Reagenzien von 2-8 °C durchgeführt, um unspezifische Zellbindungen zu vermeiden.

Um CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie CD3⁻-antigenpräsentierende Zellen (APC) zu erhalten wurde eine Separation mittels des MACS Systems von Miltenyi durchgeführt. Das MACS System basiert auf Beads, die aus supermagnetischen Partikeln bestehen, die mit einem Antikörper gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen verbunden sind (Miltenyi Biotec). Die gewünschten Zellen wurden mit diesen magnetischen Beads markiert und anschließend durch

Passage eines Magnetfeldes angezogen und von den anderen Zellen separiert. Es musste zügig gearbeitet werden und die Anzahl der Beads wurde auf die Anzahl der Zellen angeglichen.

Zunächst erfolgte die Zentrifugation der jeweiligen Zellsuspension bei 300 x g bei 4 °C für 10 Minuten bei mittlerer Beschleunigung und mittlerer Bremse. Nach Entfernung des Überstandes gab man je 80 µl Puffer und 20 µl Beads auf 10^7 Zellen hinzu. Nach vorsichtiger Resuspension schloss sich daran eine Inkubation von 15 Minuten bei 2-8 °C an. Anschließend kam 1 ml Puffer pro 10^7 Zellen dazu und das Röhrchen wurde bei 300 x g 10 Minuten lang bei mittlerer Beschleunigung und mittlerer Bremse zentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes erfolgte die Resuspension von bis zu 10^8 Zellen in 500 µl Puffer. Währenddessen wurde eine Separationssäule in den Magneten auf dem MACS Feld eingespannt und durch das Auffüllen mit 500 µl Puffer befeuchtet. Die Zellsuspension durchlief die Säule und wurde zum Waschen der gewonnenen Zellfraktion dreimal mit 500 µl Puffer durchgespült. Hierdurch wurden nur die gewünschten, markierten Zellen durch die an sie gehefteten Beads im Magnetfeld festgehalten. Nach Trennung der Säule von dem Magnetfeld platzierte man sie über einem Mikroreaktionsgefäß zum Sammeln der Zellfraktion, gab 1 ml Puffer in die Säule und überführte die Zellen mittels des Stempels zügig in ein leeres Gefäß. Durch Aufnahme der gesammelten CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in jeweils 1,5 ml TexMACS-Medium konnten diese mittels des Durchflussprinzips gezählt werden. Die gesamte Flüssigkeit, die die Säule vor Entfernung aus dem Magnetfeld durchlief, wurde für die Separation der nächsten Zellen genutzt. Bei den PBMC-Proben isolierte man die CD4⁺- und CD8⁺-Zellen und entfernte im Anschluss daran unter Durchführung des gleichen Verfahrens die CD3⁺-Zellen. Der daraus gewonnene Durchfluss nach dreimaliger Separation von Zellen enthielt keine CD3⁺-Zellen mehr und wurde anschließend daran als die CD3⁻-APC verwendet. Da die APC aus verschiedene Zellarten wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen (Rink et al., 2012) bestehen, konnten diese nicht suffizient mittels des bisher verwendeten Durchflussprinzips gemessen werden. Deswegen wurde eine Messung mit der Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zellzählkammer durchgeführt.

3.5 Zellzählung

3.5.1 Zellzählung mit der Neubauer Kammer

Aufgebaut ist die Kammer aus einem Objektträger mit zwei Kammern, die durch einen zwischengeschalteten Flüssigkeitsraum separiert sind. Die Kammern sind in vier Teile (mit jeweils 16 Quadraten) geteilt. Das Volumen jedes Quadrats entspricht 0,1 µl. Für die Zählung wurden 30 µl mit der gleichen Menge 0,4 % Trypanblaulösung vermischt und unter den Objektträger gegeben. Danach wurden vier Quadrate, die je 16 Kleinquadraten entsprechen, unter dem Mikroskop ausgezählt. Von der Anzahl der Zellen, die auf den Außenlinien zu liegen kamen, wurde nur die Hälfte in die Zählung aufgenommen. Die blaugefärbten und somit nicht lebendigen Zellen wurden hierfür nicht mitgewertet. Die Zellzahl erhielt man durch die folgende Formel:

$(\text{Anzahl der gezählten Zellen} / \text{Anzahl der gezählten Quadranten}) \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$

Die isolierten T- und APC-Zellen wurden während der Zellzahlmessung in Medium auf Eis gelagert.

3.5.2 Zellzählung nach dem Durchflussprinzip

Die Zellzählung (ausgenommen der Zählung der APC) wurde ausschließlich durch das elektrisch basierte Messverfahren des Casy® Modell TT durchgeführt.

Dafür wurden 100 µl der zu messenden Zellsuspension zu 10 ml der Elektrolytsuspension Casyton hinzugefügt. Durch dreimaliges Schwenken des Röhrchens wurden diese miteinander vermischt und anschließend unter die Kapillare des Messgeräts gestellt. Das Gerät führte jeweils dreimal mit einem Volumen von je 400 µl eine Messung durch. Dem Messvorgang lag das Widerstandsmessprinzip zu Grunde. Dabei wurde die Flüssigkeit durch die Messkapillare, an die eine elektrische Spannung angelegt wurde, eingesaugt. Intakte Zellen verdrängten das gut leitfähige Casyton und es kam zu einer Widerstandserhöhung. Diese Steigerung wurde in ein elektrisches Signal umgewandelt und aufgezeichnet. Je mehr Signale aufgezeichnet werden konnten, desto höher war die Zellzahl. Volumen und Zellgröße wurde über eine

Pulsflächenanalyse bestimmt. Dabei wurden die Signale der Zellen mit einer Frequenz von 1 MHz erfasst. Zudem wurde die Vitalität der Zellen über das Stromausschlussverfahren ermittelt. Da der Strom aus den vitalen Zellen durch Isolation der Zellmembran ausgeschlossen wurde, waren die erhaltenen Signale zur Größe der Zellen proportional. Bei abgestorbenen Zellen hingegen drang das elektrische Signal bis in das Zellinnere ein und man erhielt ein Signal, das ungefähr der Größe des Zellkerns entsprach. (Gstraunthaler and Lindl, 2013)

3.6 Ansetzen der Zellkultur

Der Versuchsaufbau bestand bei jedem Patienten aus 20 Proben, angesetzt in einer 96 Well-Rundbodenplatte. Von den T-Zellen aus dem peripheren Blut und dem Gewebe setzte man jeweils eine Probe mit einem Peptidmix aus *Candida albicans*, einem Peptidmix aus *Aspergillus fumigatus*, sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle an. Dies galt sowohl für die CD4⁺-Zellen, wie auch für die CD8⁺-Zellen. Jedem der Ansätze fügte man die zur T-Zellaktivierung notwendigen APC-Zellen in einer Zellzahl von 10⁵ pro Ansatz zu. Zum Vergleich wurden von den APC-Zellen auch Positiv-, Negativ- und Antigenansätze einzeln kultiviert. Die Wells bestanden aus 200 µl Volumen, das verwendete Medium hierfür war ein TexMACS Medium unter Zusatz von 1 % Pen/Strep. In einem Vorversuch zeigte sich, dass für die Vitalerhaltung der Zellen eine IL-2-Zytokin-Zugabe nötig war. Aus diesem Grund gab es eine IL-2 Zugabe in einer Konzentration von 30 internationalen Units/ml (IU/ml). Die Antigenkonzentration von *C. albicans* sowie *A. fumigatus* lag bei 1 µg/ml. Die Zellzahl der T-Zellen betrug 2,5 * 10⁴ mit 5 * 10⁴ APC. Diese Zellzahl wurde bei allen Proben aus Polypengewebe verwendet. Durch die geringe Zellausbeute der Nasenschleimhaut (CRSsNP und Kontrollgruppe) musste die Zellzahl bei einigen dieser Versuche verkleinert werden. Insgesamt erfolgte die Kultivierung über 6 Tage in einem Brutschrank bei 37 ° Celsius und 5 % CO₂.

3.7 Positivkontrolle

Für die Positivkontrolle wurden die „Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads“ verwendet. Diese wurden auf 2-8 °C gelagert, kurz vor dem Versuchsansatz aus

der Kühlung genommen und 30 Sekunden im Vortexmischer geschüttelt. In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 1 ml Puffer vorgelegt (PBS mit 0,1 % BSA, 2 mM EDTA, pH 7,4), die erforderliche Menge Dynabeads hinzugefügt und 5 Sekunden im Vortexmischer geschüttelt. Anschließend wurden die Mikroreaktionsgefäße für 1 Minute auf dem Dynabeads Magneten eingespannt, der Überstand abgesaugt und in das Medium für die Wells aufgenommen. Erforderlich waren dabei pro Well 2 µl Dynabeadsuspension. Nach Ansetzen der Zellkultur wurden die Zellen ebenso 6 Tage lang kultiviert.

3.8 Auswertung der Zellen an Tag 6

Am letzten Tag der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation von den Überständen separiert, das Medium aus der Kultivierung als Überstand bei -80 ° Grad eingefroren und die Zellen zur durchflusszytometrischen Messung gefärbt. Hierzu erfolgte sowohl einer Intrazellulär- als auch eine Extrazellulärfärbung. Die Extrazellulärfärbung bestand aus anti-CD45 -, anti-CD3-Antikörpern und einem Viability Dye. Der Viability Dye ist ein Vitalitätsfarbstoff, der verwendet wurde, um die Lebendigkeit der Zellen zu überprüfen. Zusätzlich wurden je nach Zellart anti-CD4/CD8-Antikörper hinzugefügt. Um die Aktivierung der Zellen zu messen erfolgte die intrazelluläre Messung von Ki67⁺. Zur Verifizierung der Ki67-Aktivität erfolgte zudem eine Isotyp-Färbung als Negativkontrolle der spezifischen Bindung des Ki67-Antikörpers. Um eine spektrale Überlappung der aufgezeichneten Signale zu vermeiden, führte man vor den Versuchen eine Kompensation am FACS-Gerät durch.

3.9 Ki67⁺ Expression der Zellen an Tag 6

Nachdem die Zellen aus dem Brutschrank entfernt wurden, erfolgte bei den Positivkontrollen die Entfernung der Dynabeads. Dafür stellte man diese Proben auf den DynaMag Magneten und überführte nach einer Minute den Inhalt in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß. Anschließend erfolgte die Zentrifugation aller Ansätze bei 1400 rpm für 5 Minuten bei mittlerer Beschleunigung und mittlerer Bremse. Der Überstand mit den Zytokinen wurde in lichtgeschützte Mikroreaktionsgefäße pipettiert und für die Zytokinmessung eingefroren.

Die Zellpellets wurden nun in je 400 µl FACS Puffer aufgenommen und jede Probe auf zwei Wells einer frischen Kulturplatte aufgeteilt. Bei 1600 rpm wurde 5 Minuten zentrifugiert. Das Mouse IgG wurde in einem Verhältnis von 1:50 mit FACS Puffer vermischt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurden die Zellen in je 25 µl des verdünnten mouse IgG gelöst und eine Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis unter Lichtentzug eingehalten. Darauffolgend wurden die Zellen in 25 µl Oberflächenfärbung gelöst und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Je zu färbender Probe wurden 30 µl der Färbung angesetzt. Bei den CD4⁺ T-Zellen bestand diese aus 28,8 µl FACS Puffer, 0,6 µl 1:10 verdünnter VD780 und jeweils 0,2 µl von Pacific Orange anti-CD45-Antikörpern, Pe/Cy7-anti-CD3-Antikörpern und Pacific Blue-anti-CD4-Antikörpern. Bei den CD8⁺ T-Zellen bestand diese aus 28,4 µl FACS Puffer, 0,6% 1:10 verdünnter VD780 jeweils 0,2 µl von Pacific Orange-anti-CD45-Antikörper und Pe/Cy7-anti-CD3-Antikörpern, sowie 0,6 µl Alexa Fluor-anti-CD8-Antikörpern. Nach Zugabe von 150 µl FACS-Puffer wurde bei 1600 rpm 5 Minuten zentrifugiert, gefolgt von einem Waschschrift mit 200 µl PBS bei 1600 rpm für 5 Minuten. Zur Fixierung der Oberflächenfärbung wurde 100 µl Perm/Fix Puffer hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Resuspendiert in 200 µl Waschpuffer wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Im Anschluss kamen 50 µl der Intrazellulärfärbung hinzu und es folgte eine 45 Minuten Inkubationszeit unter lichtgeschützten Bedingungen. Bei der Probe für die Messung der Ki67 Aktivität bestand die Färbung aus Permpuffer mit 1% PE-mouse-anti-human-Ki67-Antikörper, bei den Isoproben wurden dem Permpuffer statt den Ki67-Antikörpern 0,5% PE-mouse-anti-human-Iso-IgG-Antikörper zugesetzt. Danach folgten Waschgänge mit 150 µl und 200µl Waschpuffer. Der letzte Waschgang wurde mit 200 µl FACS-Puffer durchgeführt. Abschließend wurden die angefärbten Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zum Einlesen im Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am selben Tag über ein LSR II Durchflusszytometer.

3.10 Durchflusszytometrische TH1/TH2/TH17-Zytokinbestimmung

Für die Zytokinbestimmung wurde das Legendplex Assay von Biolegend verwendet.

Auf Grund der hohen Anzahl an Proben mussten mehrere Legendplex Kits verwendet werden. Hierbei kam es im Verlauf der Untersuchungen zu einer Neuauflage des Kits durch die Herstellerfirma Biolegend. Nach Herstellerangabe sind diese eindeutig miteinander vergleichbar, dennoch unterschied sich das Protokoll unter den verschiedenen Kits. Deswegen wurde hier auf die genaue Angabe der Färbe- und Waschgänge verzichtet und nur das zu Grunde liegende Prinzip erläutert. Im Anhang finden sich beide Protokolle (Anhang 1/Anhang2).

Das Legendplex Assay nutzt grundlegend das gleiche Prinzip wie Sandwich-Immunassays. Zu den aufgetauten Überständen der Zellen aus der Kultur wurden Beads von unterschiedlicher Größe und Fluoreszenzniveaus zugegeben. Diese banden sich durch ihre Antikörper je an ein spezielles Zytokin. Darauf folgte ein Waschvorgang und die Zugabe von biotinylierten Detection Beads. Auch diese banden sich an die Zytokine und bildeten somit Bead-Zytokin-Detectionbeads Einheiten. Darauf wurde Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugegeben und auch dieses knüpfte sich an die Detection Beads. Das SA-PE versendete beim Einlesen in das FACS ein Fluoreszenzsignal. Die Intensität dieses Signals war proportional zur Höhe der Menge des Zytokins im Überstand. Dabei konnten die vorhandenen Zytokine durch Bindung der jeweils unterschiedlichen Beads differenziert werden (Biolegend, 2020). Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem FACS Canto. Zunächst wurde eine Standardkurve durch einen vom Hersteller vorgegebenen Standardcocktail gesetzt und anschließend erfolgte die Messung der Proben.

Im Anschluss an die Messung konnte durch die Legendplex Software die Konzentration der Zytokine bestimmt werden. Für die Versuche dieser Arbeit wurde ein humaner TH1/Th2/Th17 Assay mit der Bestimmung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22, INF- γ und TNF- α verwendet.

3.11 Auswertung und Statistik

3.11.1 Gating Strategie

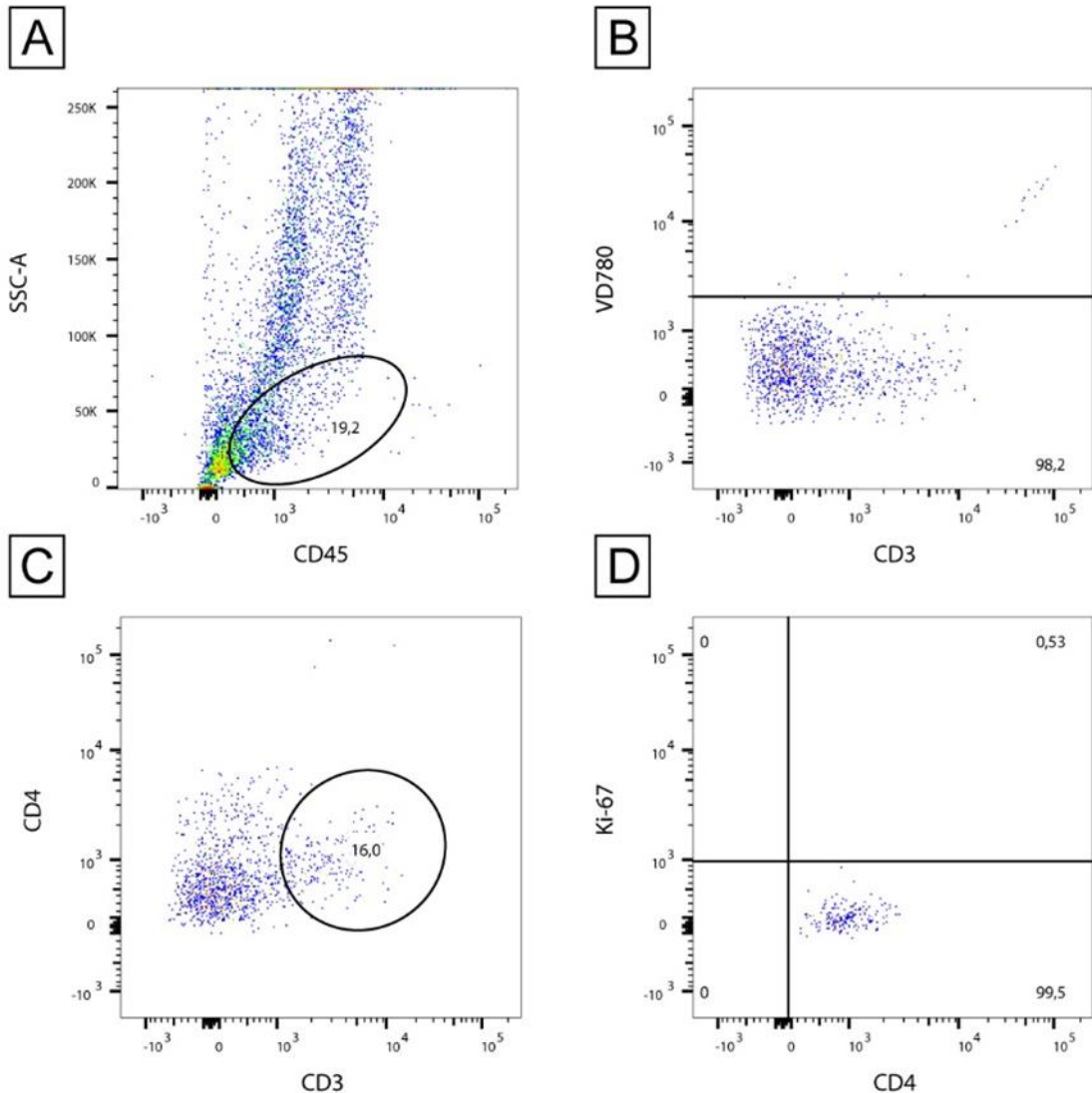


Abbildung 5: Gating Strategie CD4⁺-T-Zellen – Negativkontrolle einer Polypenprobe

Die Auswertung erfolgte über die Single Cell Analysis Software Flow Jo v10. Als Erstes wurden die Lymphozyten über das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) und ihre CD45⁺ Eigenschaften analysiert (Abbildung 5A). Im Anschluss erfolgte eine Bestimmung der lebendigen CD3⁺-Zellen über VD780 (Abbildung 5B). Der nächste Schritt war die Identifizierung der Population der CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen (Abbildung 5C) und danach erhielt man im letzten Gate die Ki67⁺ CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen (Abbildung 5D)

3.11.2 Auswertung der gemessenen Zytokinkonzentrationen

Die gemessenen Zytokinkonzentrationen konnten auf Grund der teilweise verminderten Zellzahlen der CRSsNP- und der Kontrollgruppe nicht direkt für die statistische Auswertung übernommen werden. Bei den Versuchen mit der gesunden und entzündlichen NSH wurden auch Versuche angesetzt, bei denen die Zellzahl nicht den gewünschten $2,5 \cdot 10^4$ Zellen entsprach. Die Zellen wurden hierbei mit der maximal möglichen Zellzahl angesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse an Tag 6 erfolgte dabei analog zu den anderen Versuchen. Bei der Auswertung der Zytokinkonzentrationen dagegen wurden die Werte der Ergebnisse mit verminderter Zellzahl anhand der verwendeten Zellzahl der Versuche aufmultipliziert, damit sie mit den Ansätzen mit $2,5 \cdot 10^4$ Zellen verglichen werden konnten.

Es konnten nur Zytokinkonzentrationen exakt gemessen werden, die innerhalb der Standardkurve des Assay zu liegen kamen, alle Werte, die unter oder oberhalb der Standardkurve lagen, wurden in die statistische Auswertung als äußerste Grenzwerte der Standardkurve aufgenommen.

3.11.3 Statistische Auswertung

Bei den statistischen Methoden wurden sowohl die Ergebnisse der Zytokinexpression, als auch die Ergebnisse der Ki67 Expression auf gleiche Weise mittels Graph Pad Prism Software ausgewertet. Dabei wurde bei jedem durchgeführten Test ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ angenommen. Der p-Wert wird dabei auf drei Nachkommastellen gerundet angegeben. Die Angabe des Mittelwerts sowie der Standardabweichung erfolgte mit zwei Nachkommastellen.

3.11.4 Vergleich zwischen PBMC und Gewebe

Beim Vergleich des Gewebes mit der jeweiligen PBMC wurden alle Proben mit einbezogen. Damit kam man bei den Versuchen mit dem Peptidmix *A. fumigatus* in der CRScNP-Gruppe auf 10 Proben, in der CRSsNP-Gruppe auf 8 Proben und in der Kontrollgruppe auf 7 Proben. Bei den Versuchen mit dem Peptidmix *C. albicans* kam man in der CRScNP-Gruppe auf 10 Proben, in der CRSsNP-Gruppe auf 8 Proben und in der Kontrollgruppe auf 8 Proben.

Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde zunächst der D'Agostino-Pearson (Omnibus K2) Test durchgeführt. Waren die Proben normal verteilt wurde der Paired-T-Test durchgeführt. Waren die Proben nicht normal verteilt, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt.

3.11.5 Vergleich mit Negativ- und Positivkontrollen

Beim Vergleich der jeweiligen Proben mit ihren Positiv- und Negativkontrollen wurde ebenfalls eine Normalverteilung mittels dem D'Agostino-Pearson (Omnibus K2) durchgeführt. Bestanden alle drei Gruppen den Normalitätstest wurde im Rahmen des One-way-Anova-Tests der Holm-Sidak-Test durchgeführt. War eine oder mehr der drei Gruppen nicht normalverteilt wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

3.11.6 Vergleich von CRScNP, CRSsNP und Kontrollgruppe

Bei dem Vergleich der drei Gruppen (CRSsNP, CRScNP und Kontrollgruppe) wurden bei den Versuchen mit *C. albicans* 8 Proben miteinander verglichen. Bei den Versuchen mit *A. fumigatus* wurden sieben Proben miteinander verglichen. Dabei wurde im Rahmen eines Ordinary-One-Way-Anova der Holm Sidak-Test durchgeführt.

3.12 Graphische Auswertung

Um die erhobenen Daten übersichtlich darzustellen wurden sogenannte Boxplots verwendet. Die Box in der Mitte jeder Darstellung stand dabei für 50 Prozent aller erhobener Daten. Die Begrenzung der Box nach oben hin stellte das 75-Prozent-Quartil und nach unten das 25-Prozent-Quartil dar. In jeder Box wurde der Median als horizontale Markierung eingezeichnet. Zwei sogenannte „Antennen“ oder „Whiskers“ ragten aus jeder Box und ihr jeweiliger Endpunkt stellte den Minimal- bzw. Maximalwert der Ergebnisse dar. Vereinzelt wurden in dieser Arbeit zudem Säulendiagramme verwendet. Dies war notwendig, um die Gesamtheit aller Daten der Zytokinmessung übersichtlich darzustellen. Die Ausrichtung der Säulen erfolgte in vertikaler Richtung. Die horizontale Achse zeigt die verschiedenen Zytokine und die vertikale Achse die gemessene Konzentration. Die Höhe der Säule stellt den Median dar und die

Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Die Säulendiagramme wurden ausschließlich für eine Übersicht der gemessenen Zytokinkonzentrationen verwendet. Die Messung der Normalverteilung sowie die ausführliche graphische Darstellung erfolgte über die oben beschriebenen Boxplots.

Für die Subgruppenanalyse wurden Diagramme verwendet, auf denen jeder Wert einzeln dargestellt wurde – der horizontale Strich bezeichnet hierbei den Median der verzeichneten Werte.

4 Ergebnisse

4.1 Patienteneigenschaften

Tabelle 7: Patienteneigenschaften

	Alter (Jahren)	Geschlecht (w:m)	Allergie (n)	Patienten mit Voroperationen (Anzahl)
CRScNP (n=10)	51 ± 19	2:8	-Penicillin (1) -Milben (1) -Gräser (1) -Amalgam (1)	5
CRSsNP (n=8)	40 ± 15	3:5	-Amoxicillin (1) -Milben (3) -Gräser (1) -Pollinosis (1) -Tierhaare (1)	1
Kontrolle (n=7/8) (Asp/ Cand)	35 ± 18	0:7/0:8 Asp/Cand	-Amoxicillin (1) -Milben (1) -Gräser (1) -Tierhaare (1) -Tillidin (1)	2

4.2 Vorversuche

Ein erster Vorversuch bestand in dem Nachweis der erfolgreichen positiven Separation der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, sowie der erfolgreichen negativen Selektion der CD3⁺-Zellen aus PBMC und Polypengewebe. Die Bilder mit dem Nachweis der erfolgreichen Isolation der Zellen finden sich im Anhang (Anhang 3/Anhang 4).

Um die perfekte Konzentration der Peptidmische für die Versuche zu bestimmen, wurden zusätzlich zwei Vorversuche angesetzt. Es erfolgte die Kultivierung von PBMC mit drei verschiedenen Konzentrationen der beiden Peptidmische (*A. fumigatus* und *C. albicans*). Die Konzentration betrug dabei 1 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0,04 µg/ml. Der erste Versuch wurde dabei in doppelter Ausführung angesetzt und sowohl an Tag 4 als auch an Tag 6 über die Ki67-Aktivität ausgewertet. Die Auswertung des zweiten Versuchs erfolgte nur an Tag 6. Es zeigte sich die höchste messbare Ki67 Aktivität an Tag 6 und mit einer Antigenkonzentration von 1 µg/ml.

Für die Auswahl der Positivkontrolle wurden PBMC mit anti-human-CD3⁺-Antikörpern, einem T-Cell-activation/expansion Kit und CD3/CD28 Dynabeads über sechs Tage kultiviert. Dabei konnte die beste Stimulation der Zellen mit den CD3/CD28 Dynabeads festgestellt werden.

4.3 Spezifische Aktivierung der T-Zellen

4.3.1 Spezifische Aktivierung der T-Zellen durch *A. fumigatus*

4.3.1.1 Periphere und ortständige T-Zellen im Vergleich

Bei den Patienten mit CRScNP konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus Polypengewebe (15,3 ± 8,57%) und peripheren CD4⁺ T-Zellen aus PBMC (13,44 ± 11,41%) festgestellt werden (Abbildung 6A). Ebenso konnte kein Unterschied in der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Polyp 29,45 ± 16,60% vs. PBMC 23,07 ± 16,85%) (Abbildung 6B).

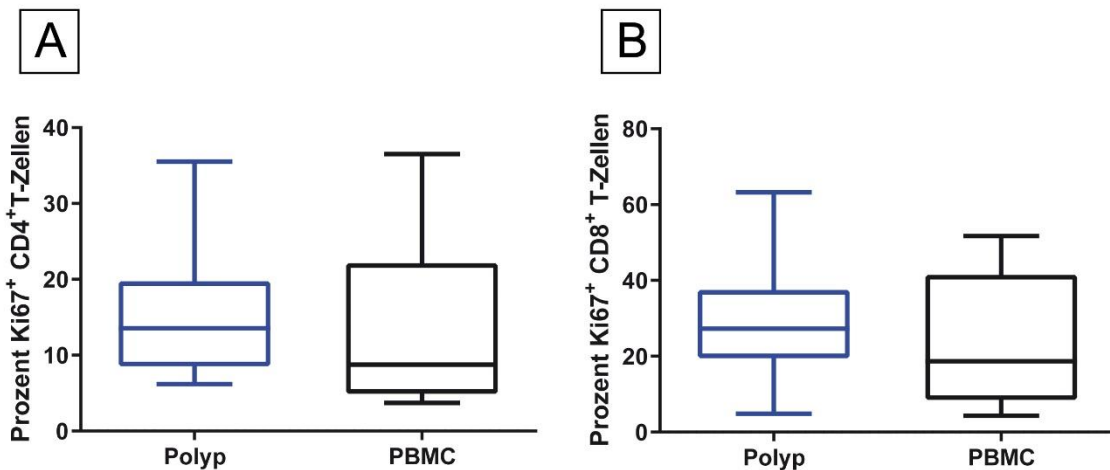


Abbildung 6: Vergleich der Ki-67-Aktivität der lokalen T-Zellen (Polyp) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRSsNP nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*

A: CD4⁺ T-Zellen ($p=0,625$); B: CD8⁺ T-Zellen ($p=0,318$)

Bei Patienten mit CRSsNP konnte ebenso kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung zwischen lokalen T-Zellen aus entzündlicher Nasenschleimhaut und peripheren T-Zellen festgestellt werden. Dies zeigte sich sowohl bei den CD4⁺-T-Zellen (NSH $6,69 \pm 5,38\%$ vs. PBMC $9,47 \pm 6,33\%$, Abbildung 7A), als auch bei den CD8⁺-T-Zellen (NSH $33,94 \pm 27,02\%$ vs. PBMC $27,12 \pm 17,19\%$, Abbildung 7B)

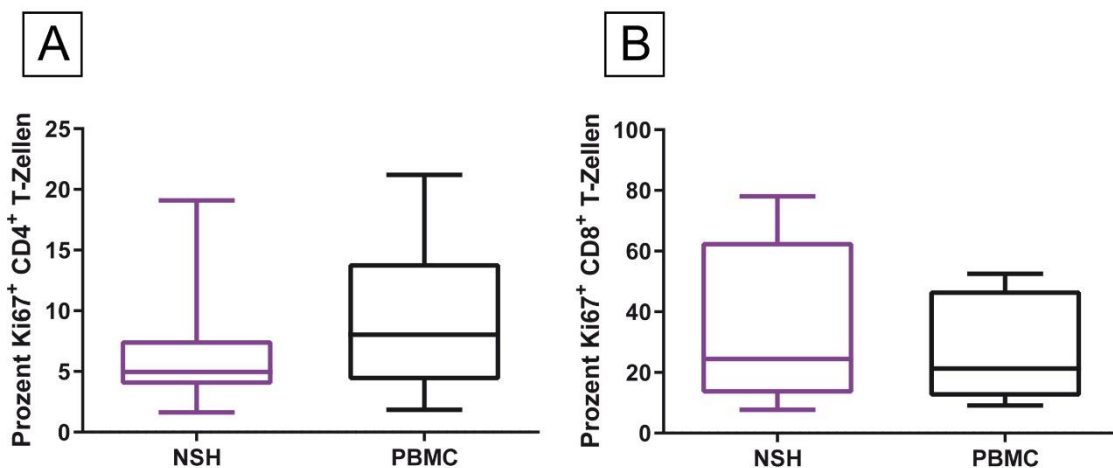


Abbildung 7: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (entz. NSH) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRSsNP nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*

A: CD4⁺-T-Zellen ($p=0,148$); B: CD8⁺-T-Zellen ($p=0,201$)

Bei der Kontrollgruppe ergab sich für die CD4⁺ T-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen gesunder NSH (10,00 ± 11,53%) und PBMC (8,27 ± 6,83%) (Abbildung 8A). Ebenso konnten keine Unterschiede in der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 8B) festgestellt werden (NSH 27,62 ± 26,33% vs. PBMC 28,49 ± 20,66%).

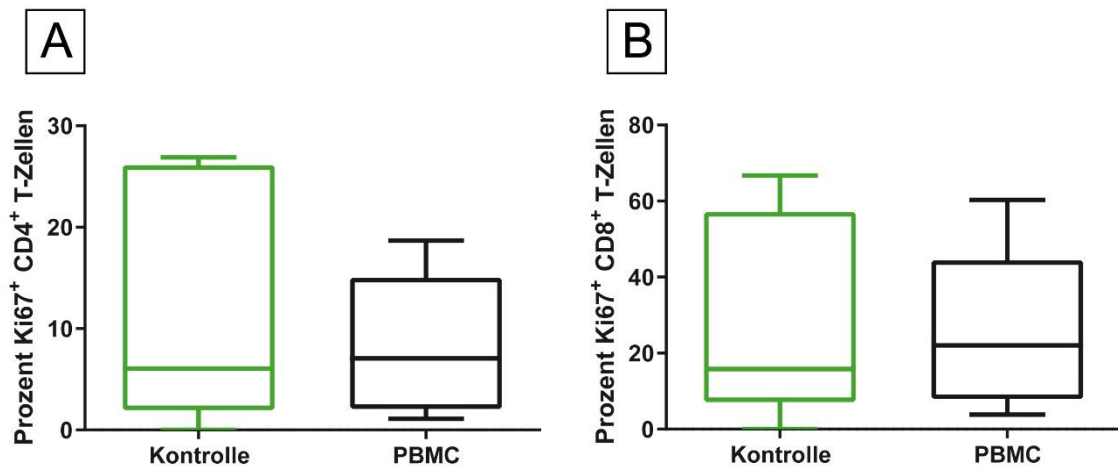


Abbildung 8: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (gesunde NSH (grün)) und peripheren T-Zellen (PBMC (schwarz)) von gesunden Patienten aus der Kontrollgruppe nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*

A: CD4⁺ T-Zellen (p=0,938); B: CD8⁺ T-Zellen(p=0,813)

4.3.1.2 Vergleich der ortsständigen T-Zellen

4.3.1.2.1 CD4⁺ T-Zellen

Bei der Aktivierung ortständiger CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 9A) aus dem Gewebe (Polyp, entzündliche NSH und gesunde NSH) konnte ein signifikanter Unterschied in der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit CRScNP (17,67 ± 9,08%) im Vergleich zu Patienten mit CRSsNP (4,92 ± 2,12%) festgestellt werden (p=0,036).

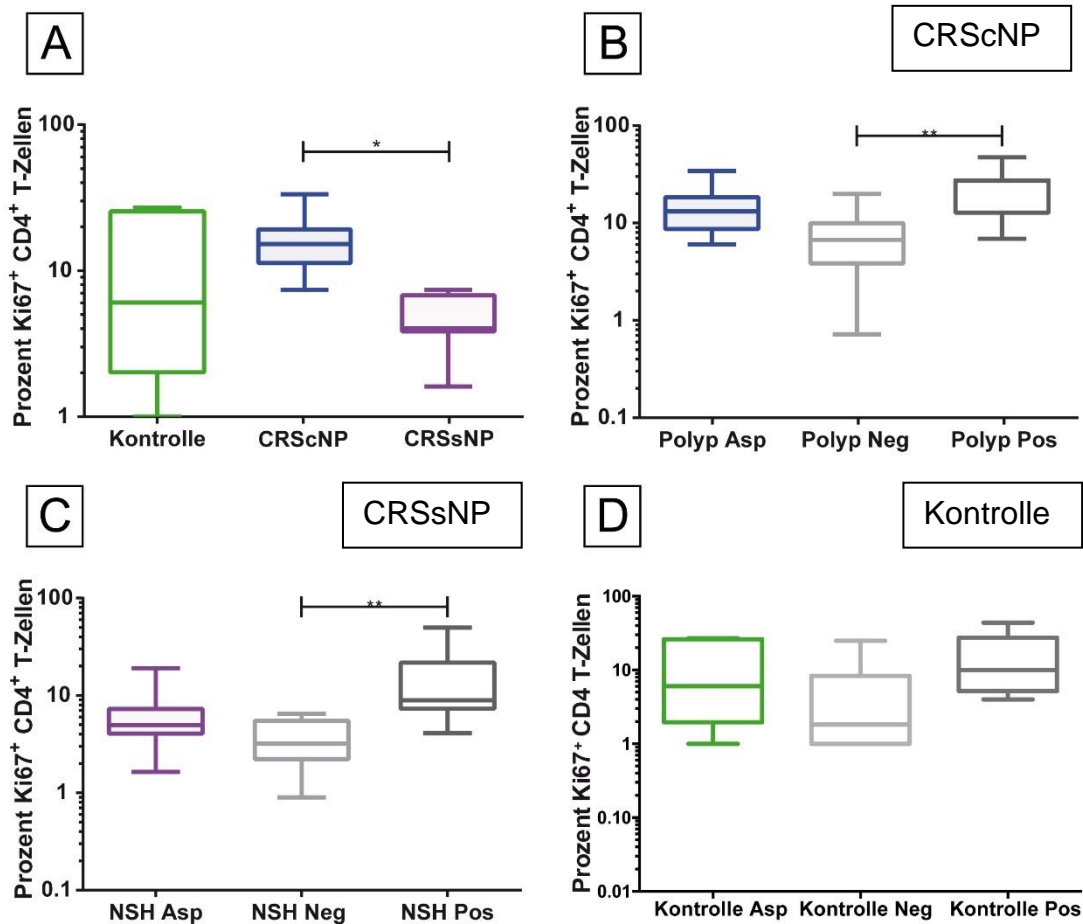


Abbildung 9: Vergleich der Ki67-Aktivität ortständiger CD4⁺ T-Zellen

A: signifikant höherer Anteil Ki67⁺ CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit CRScNP im Vergleich zu Patienten mit CRSsNP ($p=0,036$), keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und CRScNP ($p=0,209$) und Kontrolle zu CRSsNP ($p=0,282$);

B: signifikant höherer Anteil Ki67⁺ ortständiger CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit CRScNP zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ($p=0,002$), keine signifikanten Unterschiede zwischen des aspergillusexponierten Polypenproben und ihrer Positivkontrolle ($p=0,443$) sowie ihrer Negativkontrolle ($p=0,143$);

C: signifikant höherer Anteil Ki67⁺ ortständiger CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit CRSsNP zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ($p=0,003$), keine signifikanten Unterschiede zwischen den aspergillusexponierten NSH-Proben und der Positivkontrolle ($p=0,156$) sowie der Negativkontrolle ($p=0,57$);

D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede Ki67⁺ ortständiger CD4⁺ T-Zellen aus NSH von Patienten der Kontrollgruppe nach Kultivierung mit *A. fumigatus* zwischen der Positiv- und Negativkontrolle ($p=0,093$). Ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den aspergillusexponierten NSH-Proben und ihrer Positivkontrolle ($p=0,843$) sowie der Negativkontrolle ($p=0,843$);

4.3.1.2.2 CD8⁺ T-Zellen

Bei der Aktivierung der ortständigen CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 10) gab es im Vergleich zwischen Patienten mit CRScNP ($36,06 \pm 14,89\%$), CRSsNP ($27,64 \pm 21,95\%$) und der Kontrollgruppe ($27,62 \pm 26,33\%$) keine signifikanten Unterschiede.

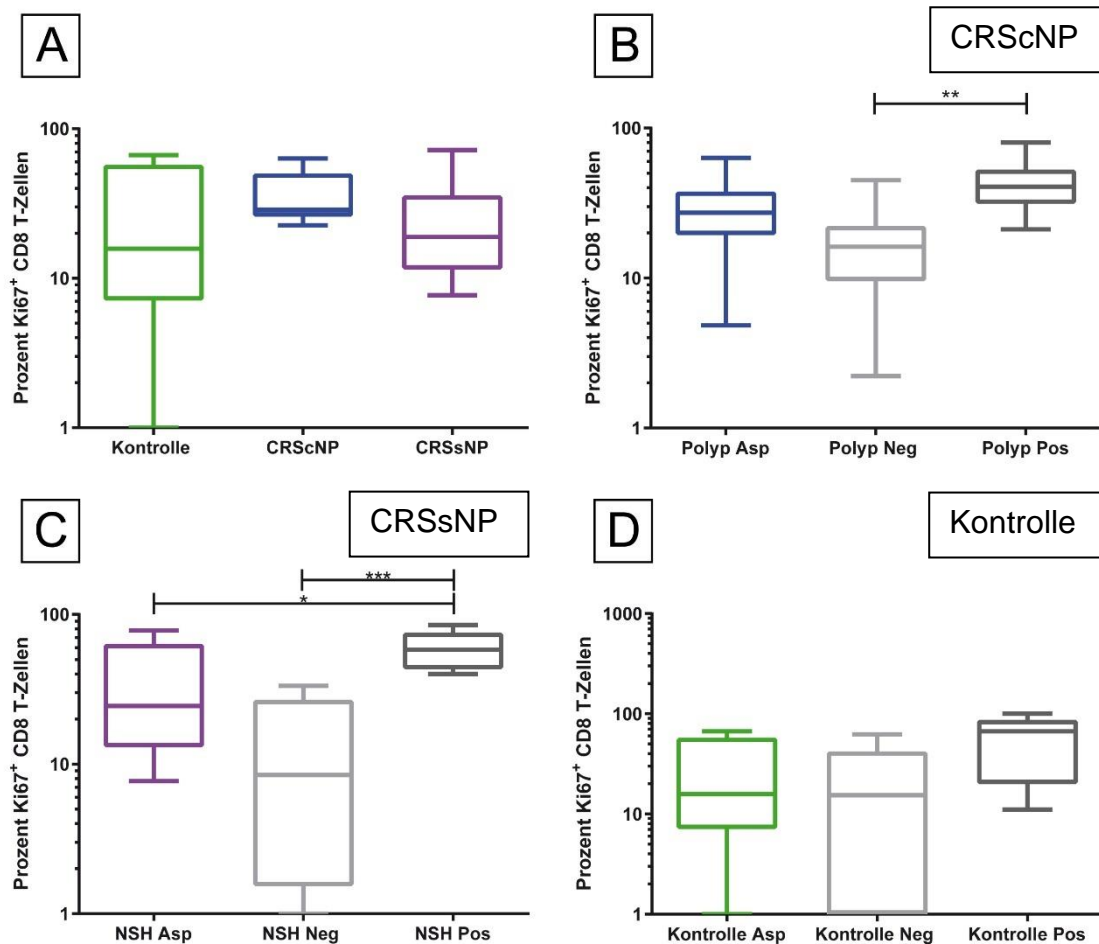


Abbildung 10: Vergleich der Ki67-Aktivität ortständiger CD8⁺ T-Zellen

A: Kein Nachweis signifikanter Unterschiede Ki67⁺ CD8⁺ T-Zellen bei Patienten der Kontrollgruppe im Vergleich zu Patienten mit CRScNP ($p=0,854$), sowie zu Patienten mit CRSSNP ($p=0,998$). Ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit CRScNP und mit CRSSNP ($p=0,854$);
 B: signifikant höherer Anteil Ki67⁺ ortständiger CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit CRScNP zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ($p=0,002$), keine signifikanten Unterschiede zwischen des aspergillusexponierten Polypenproben und ihrer Positivkontrolle ($p=0,096$) sowie ihrer Negativkontrolle ($p=0,096$);
 C: signifikant höherer Anteil Ki67⁺ ortständiger CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit CRSSNP zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ($p=0,001$), sowie zwischen aspergillusexponierten T-Zellen und ihrer Positivkontrolle ($p=0,040$); keine signifikanten Unterschiede zwischen den aspergillusexponierten NSH-Proben und der Negativkontrolle ($p=0,052$);
 D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede Ki67⁺ ortständiger CD8⁺ T-Zellen aus NSH von Patienten der Kontrollgruppe nach Kultivierung mit *A. fumigatus* zwischen der Positiv- und Negativkontrolle ($p=0,109$). Ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den aspergillusexponierten NSH-Proben und ihrer Positivkontrolle ($p=0,253$) sowie der Negativkontrolle ($p>0,999$);

4.3.1.2.3 Vergleich der peripheren T-Zellen

Bei dem Vergleich der Aktivierung der peripheren CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 11A) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der CRScNP- (15,16

$\pm 12,57\%$) und den Proben der CRSsNP- ($7,79 \pm 4,53\%$) und denen der Kontrollgruppe ($8,27 \pm 6,82\%$) festgestellt werden.

Ebenso konnte bei den peripheren CD8⁺ T-Zellen zwischen den Proben der CRScNP- ($24,27 \pm 16,76\%$), der CRSsNP- ($23,50 \pm 14,91\%$) und der Kontrollgruppe ($28,49 \pm 20,66\%$) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 11B)

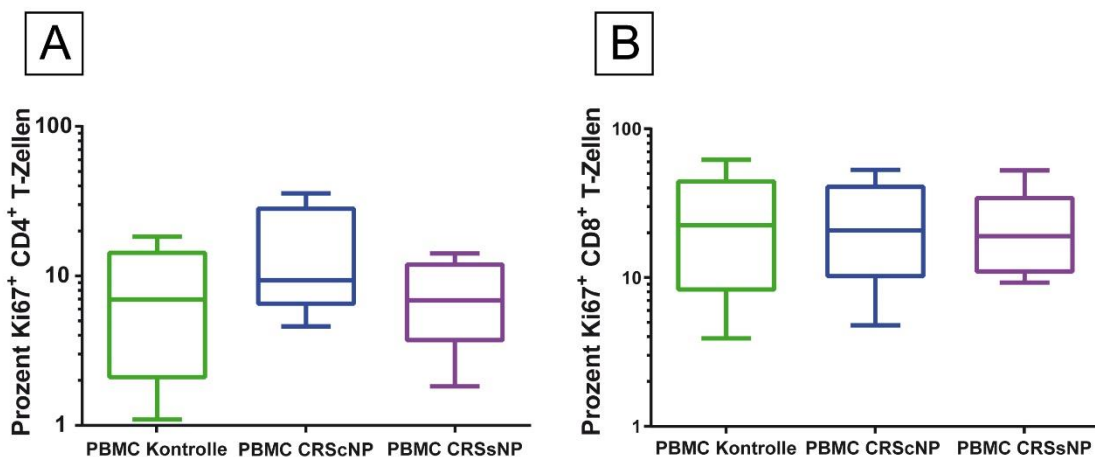


Abbildung 11: Vergleich der Aktivität peripherer T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*: Kontrolle (grün), CRScNP (blau), CRSsNP (lila)

A: CD4⁺ T-Zellen (Kontrolle zu CRScNP, $p=0,340$, Kontrolle zu CRSsNP, $p=0,919$, CRScNP zu CRSsNP, $p=0,340$)
 B: CD8⁺ T-Zellen (Kontrolle zu CRScNP, $p=0,937$, Kontrolle zu CRSsNP, $p=0,937$, CRScNP zu CRSsNP, $p=0,937$)

4.3.2 Spezifische Aktivierung der T-Zellen durch *C. albicans*

4.3.2.1 Periphere und ortständige T-Zellen im Vergleich

Bei den Patienten mit CRScNP konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen aus Polypengewebe ($14,01 \pm 8,32\%$) und peripheren CD4⁺ T-Zellen aus PBMC ($9,75 \pm 10,08\%$) festgestellt werden (Abbildung 12A).

Ebenso konnte kein Unterschied in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Polyp $23,63 \pm 16,02\%$ vs. PBMC $15,77 \pm 11,57\%$) (Abbildung 12B).

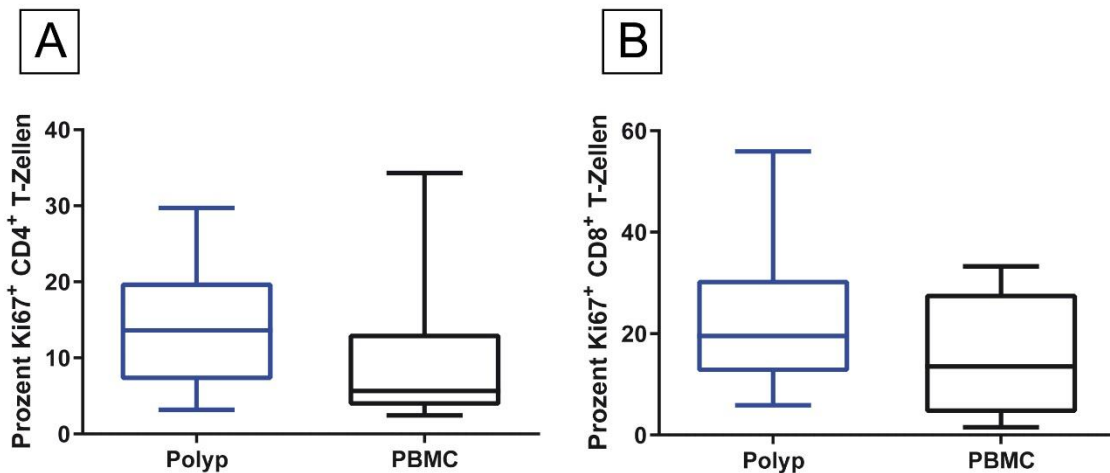


Abbildung 12: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (Polyp) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRSsNP nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*.

A: CD4⁺ T-Zellen, $p=0,275$; B: CD8⁺ T-Zellen, $p=0,094$

Bei der CRSsNP-Gruppe ergab sich für die CD4⁺ T-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der entzündlichen NSH ($9,67 \pm 5,68\%$) und der der PBMC ($7,80 \pm 4,97\%$) (Abbildung 13A). Bei dem Vergleich der CD8⁺ T-Zellen der beiden Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (NSH $22,82 \pm 18,14$ vs. PBMC $14,34 \pm 15,00\%$, $p=0,039$) (Abbildung 13B).

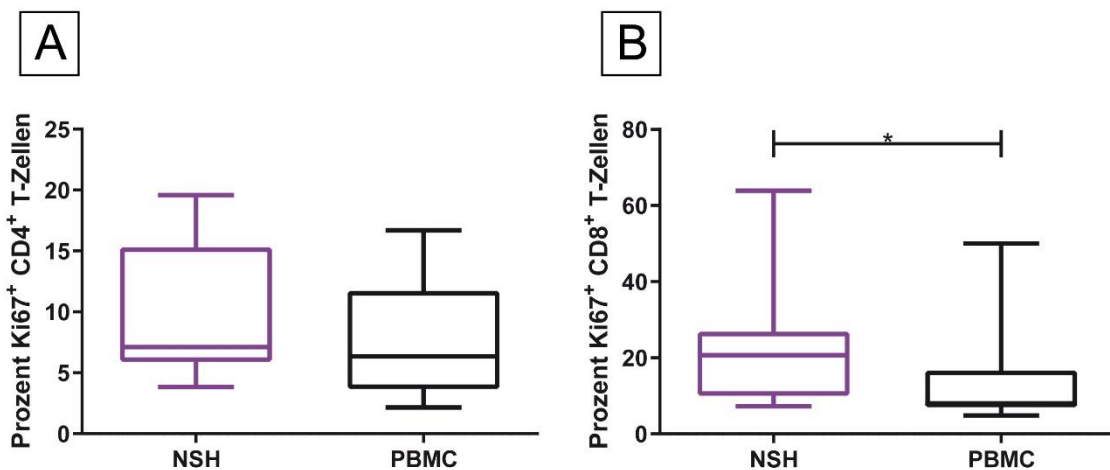


Abbildung 13: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (entz. NSH) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRSsNP nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*.

A: CD4⁺ T-Zellen, $p=0,416$; B: CD8⁺ T-Zellen, $p=0,039$

Bei den Patienten aus der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung im Vergleich zwischen lokalen T-Zellen aus gesunder NSH und peripheren T-Zellen festgestellt werden sowohl bei CD4⁺ (NSH $14,52 \pm 18,26\%$

vs. PBMC $13,99 \pm 18,73\%$) (Abbildung 14A), als auch bei CD8⁺ (NSH $18,8 \pm 23,12\%$ vs. PBMC $19,30 \pm 17,21\%$) (Abbildung 14B).

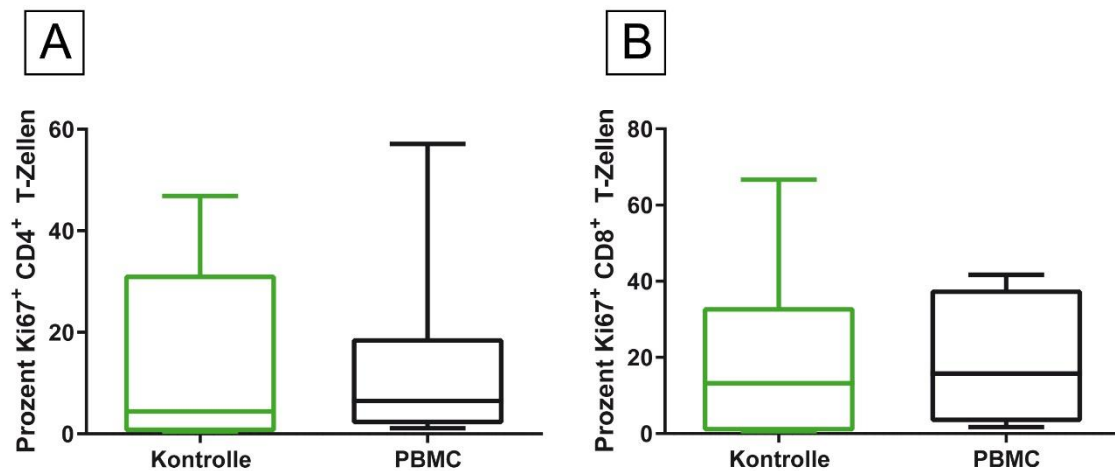


Abbildung 14: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (gesunde NSH) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten aus der Kontrollgruppe nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*.

A: CD4⁺ T-Zellen, $p=0,641$; B: CD8⁺ T-Zellen, $p=0,945$

4.3.2.2 Vergleich der ortständigen T-Zellen

Bei dem Vergleich der ortständigen T-Zellen untereinander (Abbildung 15) wurden die Aktivität der Zellen nach der 6-tägigen Kultur mit *C. albicans* aus dem Gewebe miteinander verglichen (Polyp, entzündliche NSH und NSH von gesunden Probanden).

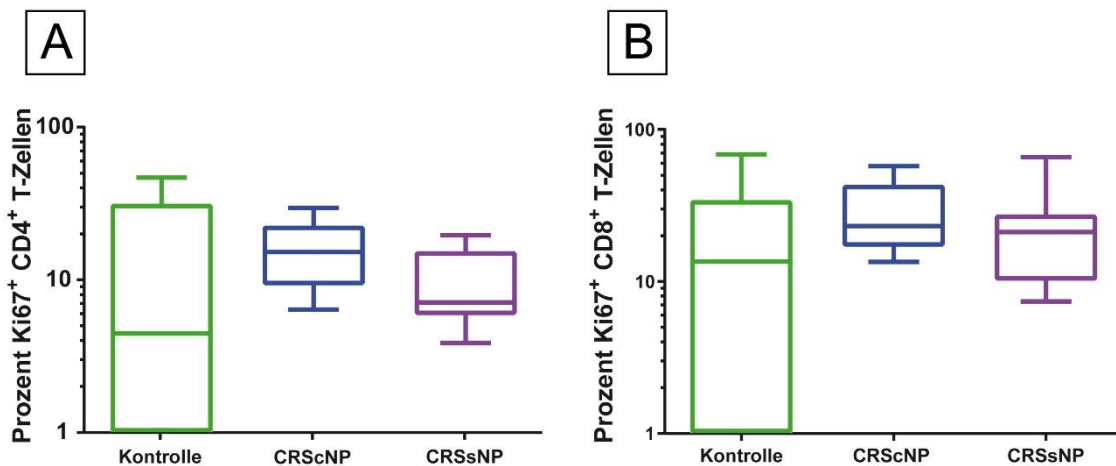


Abbildung 15: Ki67-Aktivität der ortständigen CD4⁺-T-Zellen im Vergleich (CRScNP, CRSsNP, Kontrolle) nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*:

A: CD4⁺-T-Zellen: Kontrolle zu CRScNP, $p=0,780$; Kontrolle zu CRSsNP, $p=0,669$; CRScNP zu CRSsNP, $p=0,635$
 B: CD8⁺-T-Zellen, $p=$ Kontrolle zu CRScNP, $p=0,759$; Kontrolle zu CRSsNP, $p=0,863$; CRScNP zu CRSsNP, $p=0,863$

Bei dem Vergleich der Aktivierung ortständiger CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 15A) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kontrolle $14,52 \pm 18,26\%$ vs. CRScNP $16,20 \pm 7,77\%$ vs. CRSsNP $9,67 \pm 5,68\%$).

Ebenso ergab sich für die ortständigen CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 15B) kein signifikanter Unterschied (Kontrolle $18,87 \pm 23,12\%$ vs. CRScNP $27,53 \pm 15,56\%$ vs. CRSsNP $22,82 \pm 18,14\%$).

4.3.2.3 Vergleich der peripheren T-Zellen

Bei dem Vergleich der Aktivität peripherer T-Zellen der drei Gruppen konnten sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen (Kontrolle $13,99 \pm 18,73\%$ vs. CRScNP $11,12 \pm 10,91\%$ vs. CRSsNP $7,80 \pm 4,97\%$) (Abbildung 16A), als auch bei den CD8⁺ T-Zellen (Kontrolle $19,30 \pm 17,21\%$ vs. CRScNP $19,16 \pm 10,31\%$ vs. CRSsNP $14,34 \pm 14,10\%$) (Abbildung 16B) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

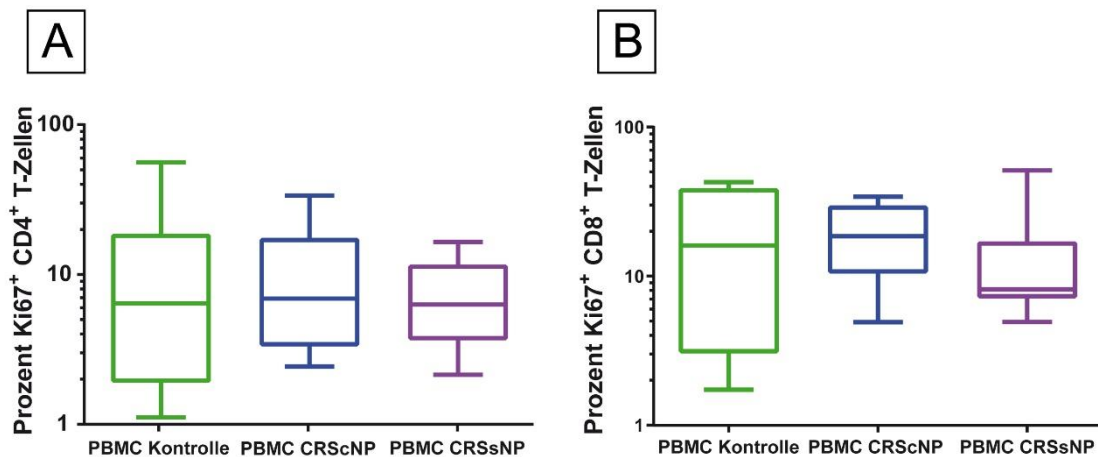


Abbildung 16: Ki67-Aktivität der peripheren-T-Zellen im Vergleich (CRScNP, CRSSNP, Kontrolle) nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*:

A: CD4⁺-T-Zellen, Kontrolle vs. CRScNP, $p=0,844$; Kontrolle vs. CRSSNP, $p=0,712$; CRScNP vs. CRSSNP, $p=0,844$
 B: CD8⁺-T-Zellen, Kontrolle vs. CRScNP, $p=0,984$; Kontrolle vs. CRSSNP, $p=0,875$; CRScNP vs. CRSSNP, $p=0,875$

4.3.3 Subgruppenanalyse der spezifischen Aktivierung ortständiger T-Zellen

Bei der Betrachtung der spezifischen Aktivierung der Zellen konnte innerhalb einer Gruppe und einer Zellart eine hohe Variabilität der einzelnen Versuche festgestellt werden. Dabei ließen sich Versuchsgruppen mit hoher Aktivierung (Responder) von Versuchsgruppen mit niedriger Aktivierung (Nonresponder) differenzieren.

4.3.3.1 Nonresponder und Responder nach Kultur mit *A. fumigatus*

Bei dem Vergleich der Aktivierung der Subgruppen aus ortständigen T-Zellen aus Polypengewebe von Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *A. fumigatus* konnten sowohl bei CD4⁺ (Abbildung 17A) als auch bei CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 17B) tendentiell ein Unterschied bei der Aktivierung der Zellen erkannt werden.

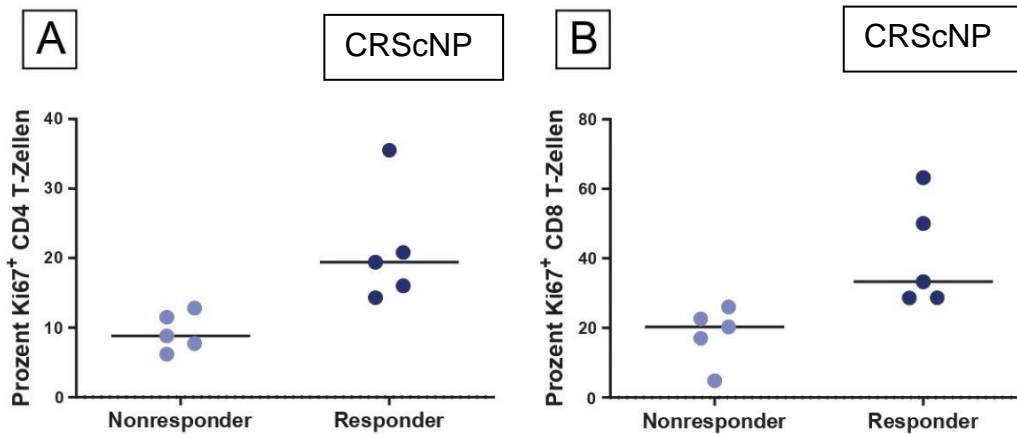


Abbildung 17: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRScNP
 A: Subgruppen der CD4⁺ T-Zellen und deren Median; B: Subgruppen der CD8⁺ T-Zellen und deren Median

Ebenso ließ sich bei den Patienten mit CRSSNP sowohl bei ortständigen CD4⁺(Abbildung 18A), als auch bei ortständigen CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 18B) ein Trend zwischen den Subgruppen feststellen.

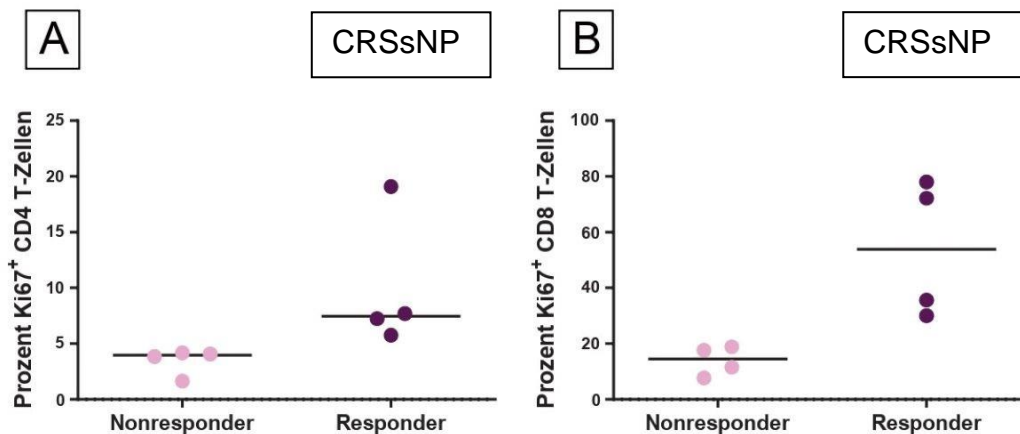


Abbildung 18: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRSSNP
 A: Subgruppen der CD4⁺ T-Zellen und deren Median; B: Subgruppen der CD8⁺ T-Zellen und deren Median

4.3.3.2 Nonresponder und Responder nach Kultur mit *C. albicans*

Bei dem Vergleich der Aktivierung der Subgruppen aus ortständigen T-Zellen aus Polypengewebe von Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *C. albicans* konnten

sowohl bei CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 19A) als auch bei CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 19B) tendentiell ein Unterschied bei der Aktivierung der Zellen erkannt werden.

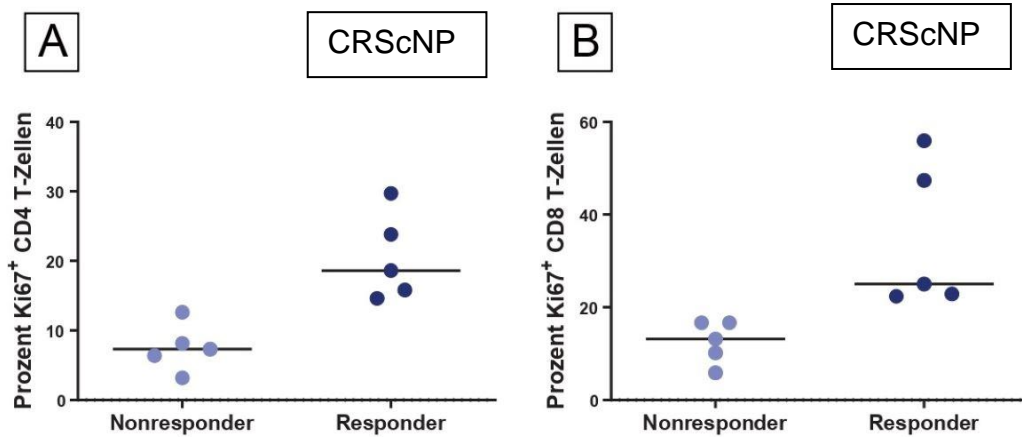


Abbildung 19: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *C. albicans* A: Subgruppen der CD4⁺ T-Zellen und deren Median; B: Subgruppen der CD8⁺ T-Zellen und deren Median

Ebenso ließ sich bei den Patienten mit CRSsNP sowohl bei ortständigen CD4⁺(Abbildung 20A), als auch bei ortständigen CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 20B) ein Trend zwischen den Subgruppen feststellen.

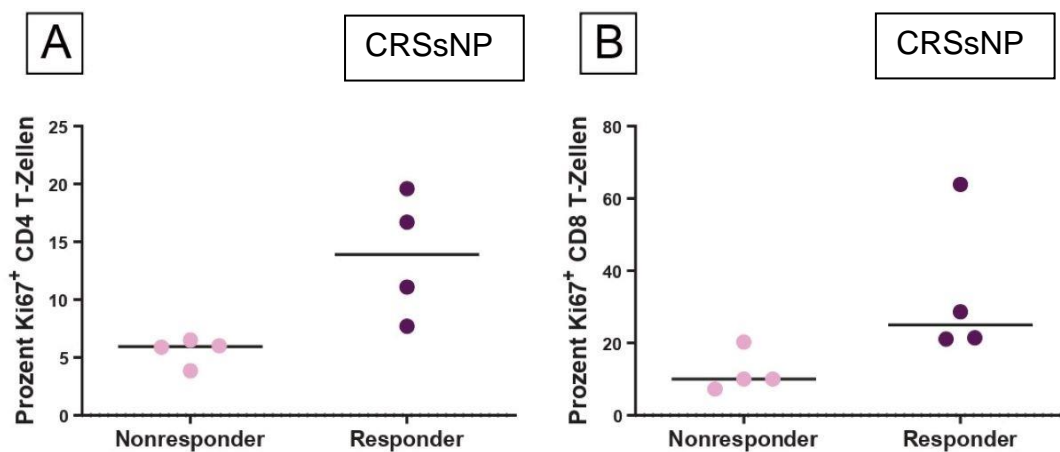


Abbildung 20: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRSsNP nach Kultur mit *C. albicans* A: Subgruppen der CD4⁺ T-Zellen und deren Median; B: Subgruppen der CD8⁺ T-Zellen und deren Median

4.4 Zytokinexpression der T-Zellen

Aus den Überständen der 6-tägigen Kultur wurden die Zytokinkonzentrationen der einzelnen Proben mittels Legendplex Assay ermittelt. Diese Ergebnisse wurden wie unter 3.11.2 und 3.11.3 beschrieben verwendet und ausgewertet.

4.4.1 Zytokinexpression nach Kultur mit *Aspergillus fumigatus*

Die gemessenen Zytokine nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus* ließen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1/Th17 (Abbildung 21) und Th2 (Abbildung 22) unterteilen. Signifikante Unterschiede wurden je Zytokin im Vergleich der drei Gruppen (CRScNP-, CRSsNP- und Kontrollgruppe) ausgewertet und eingetragen

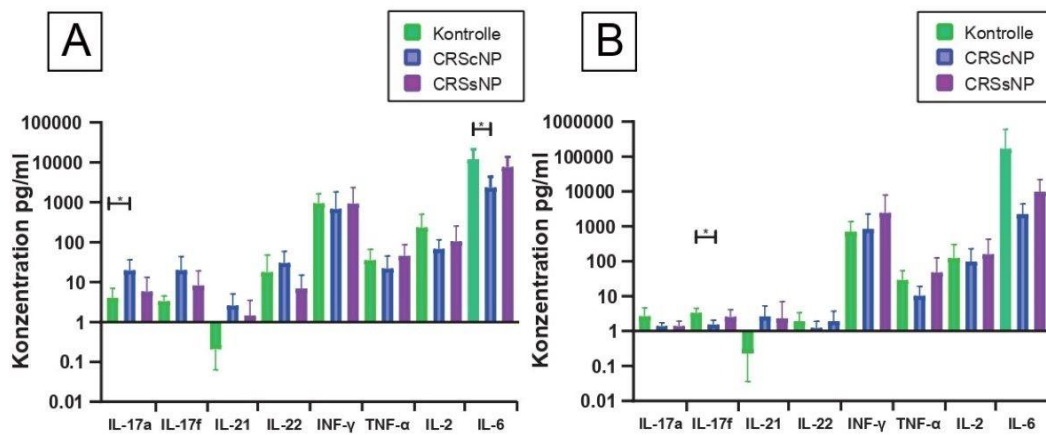


Abbildung 21: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th1/Th17-Musters nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*; A: der CD4⁺-T-Zellen aus dem Gewebe; B: der CD8⁺-T-Zellen aus dem Gewebe

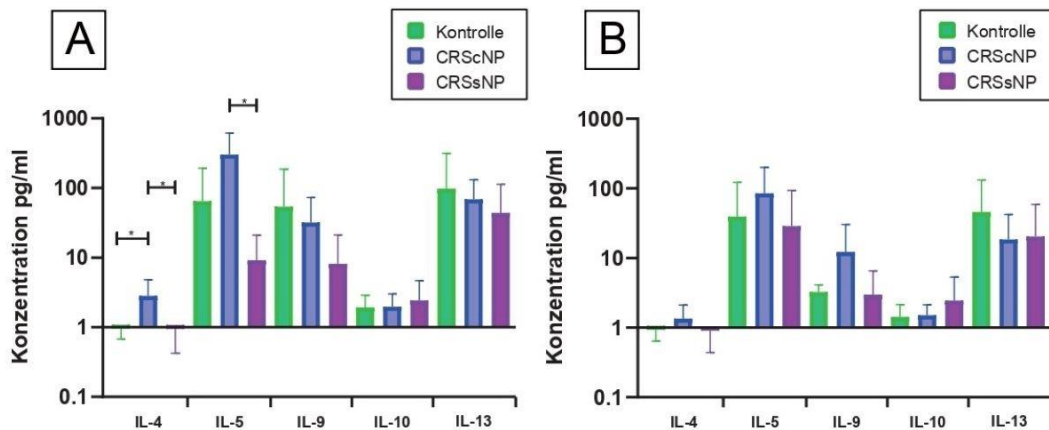


Abbildung 22: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th2-Musters nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*; A: der CD4⁺-T-Zellen aus dem Gewebe; B: der CD8⁺-T-Zellen aus dem Gewebe

Dabei ließen sich zwischen den einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede nachweisen (Tabelle 8). Diese werden im Folgenden noch ausführlicher besprochen.

Tabelle 8: Bei dem Vergleich der CRScNP-, CRSsNP- und Kontrollgruppe signifikant veränderte Zytokinkonzentrationen nach 6-tägiger Kultur mit *A. fumigatus*

	CRScNP		CRSsNP	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Th1/Th17	IL-17a IL-6	IL-17f		
Th2	IL-4 IL-5		IL-4 IL-5	

4.4.1.1 Signifikante Unterschiede im Bereich des TH1/TH17 Zytokinmusters

Bei den gemessenen Zytokinen, die unter das Th1/Th17 Zytokinmuster fielen, gab es bei den Zytokinen IL17-a, IL-17f und IL-6 signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

4.4.1.1.1 Zytokin IL-17a

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD4⁺-T-Zellen konnte bei IL-17a (Abbildung 23A) ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen der CRScNP- ($19,62 \pm 16,66$ pg/ml) und der Kontrollgruppe ($4,01 \pm 2,97$ pg/ml) festgestellt werden. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich im Vergleich zur CRSsNP-Gruppe ($5,78 \pm 7,57$ pg/ml).

Bei dem Vergleich der Zytokinexpression von IL-17a der Patienten mit CRScNP ergab sich im Vergleich zwischen ortständigen ($78,46 \pm 194,5$ pg/ml) und peripheren ($1,68 \pm 1,71$ pg/ml) CD4⁺-T-Zellen ein signifikanter Unterschied ($p=0,004$). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich bei dem Vergleich dieser zwei Gruppen kein signifikanter Unterschied (NSH $4,01 \pm 2,97$ pg/ml vs. PBMC $9,84 \pm 18,34$ pg/ml).

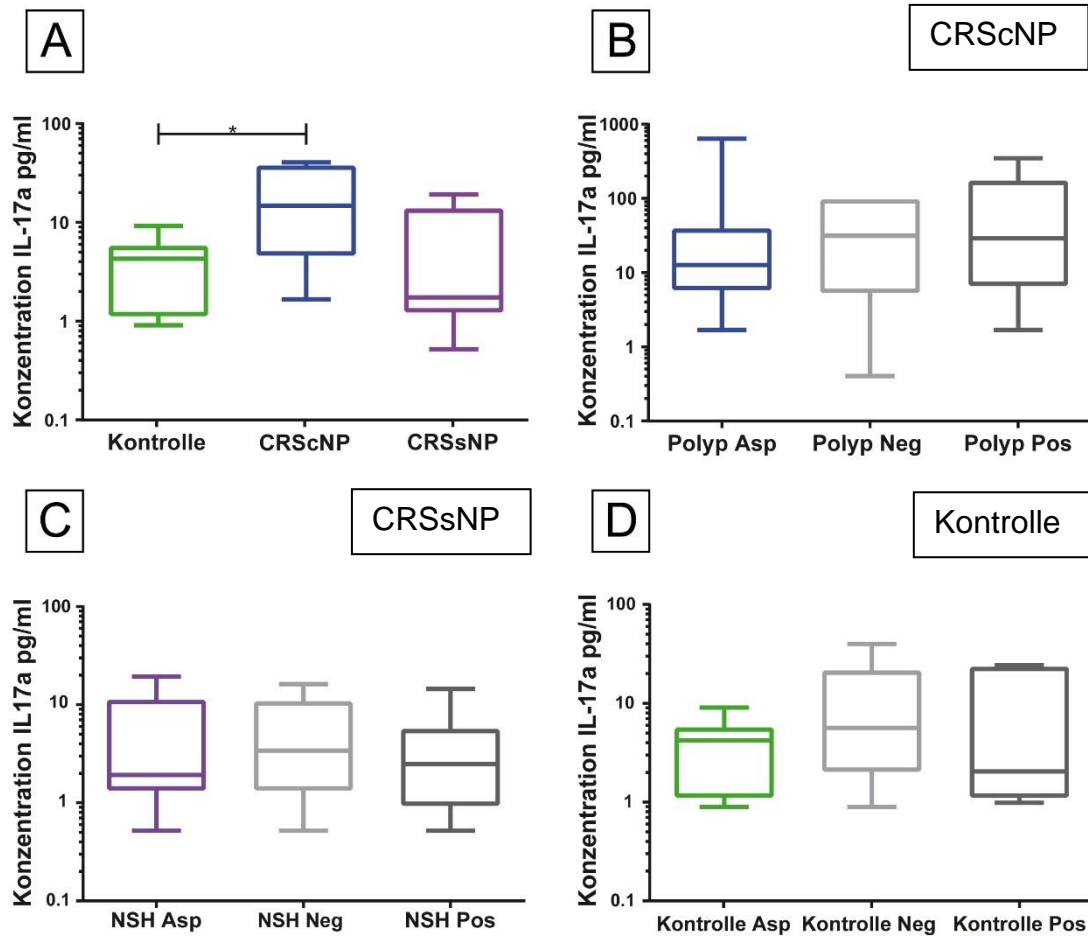


Abbildung 23: Zytokinexpression IL-17a der ortständigen CD4⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Aspergillus

A: signifikant höhere Konzentration von IL-17a der CRScNP- im Vergleich zu der der Kontrollgruppe ($p=0,041$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der CRSsNP- gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,760$) und der CRScNP-Gruppe ($p=0,052$)

B: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17a-Konzentrationen von CD4⁺ T-Zellen aus Polyp vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

C: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17a-Konzentrationen von CD4⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17a-Konzentrationen von gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,810$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

4.4.1.1.2 Zytokin IL-17f

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD8⁺-T-Zellen konnte bei IL-17f (Abbildung 24A) ein signifikanter Unterschied zwischen der CRScNP- ($1,54 \pm 0,52$ pg/ml) und der Kontrollgruppe ($3,34 \pm 1,11$ pg/ml) festgestellt werden.

Bei der Zytokinexpression von IL-17f der Patienten mit CRScNP ergab sich im Vergleich zwischen ortständigen ($1,58 \pm 0,47$ pg/ml) und peripheren ($2,20 \pm 2,09$

pg/ml) CD8⁺-T-Zellen kein signifikanter Unterschied ($p=0,005$). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich bei dem Vergleich dieser zwei Gruppen ebenso kein signifikanter Unterschied ($p>0,999$).

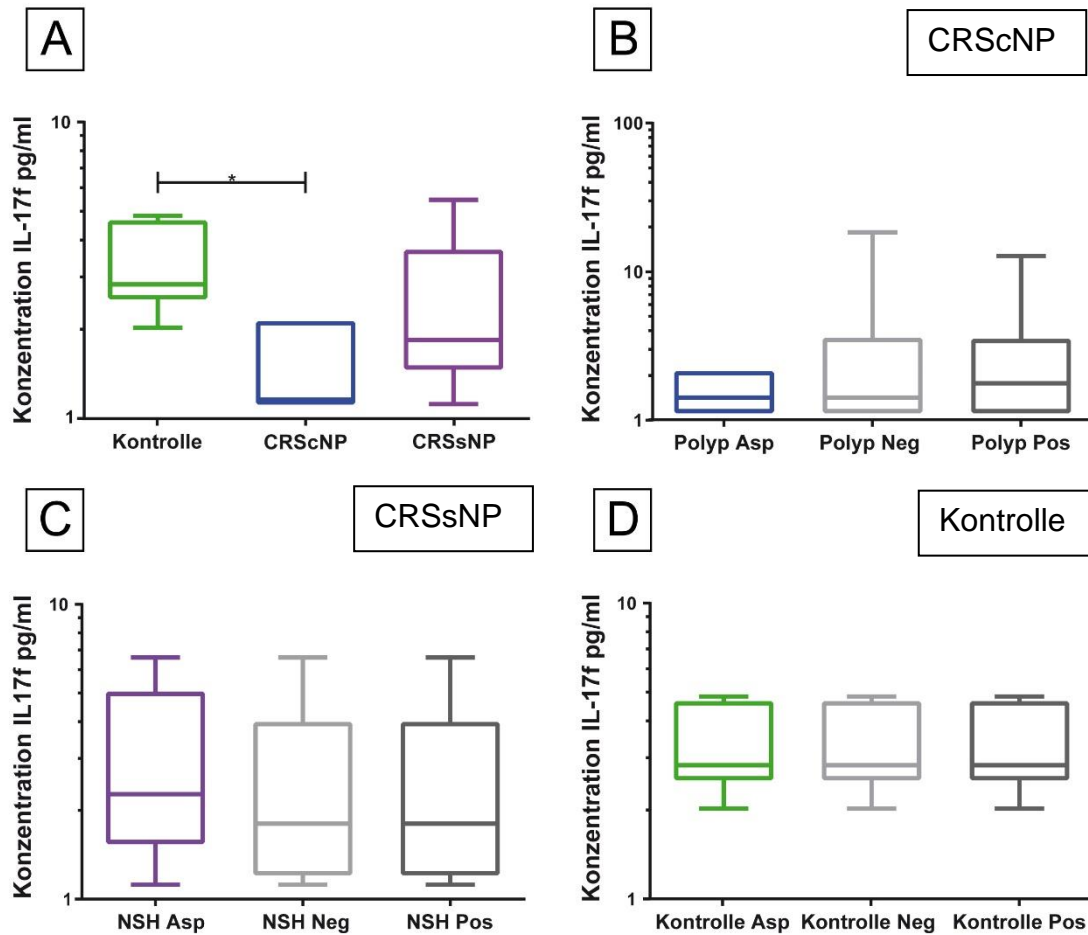


Abbildung 24: Zytokinexpression IL-17f der ortständigen CD8⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Aspergillus

A: signifikant höhere Konzentration von IL-17f der Kontrollgruppe im Vergleich zu der der CRScNP-Gruppe ($p=0,025$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der CRSsNP- gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,229$) und der CRScNP-Gruppe ($p=0,197$)
 B: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17f-Konzentrationen von CD8⁺ T-Zellen aus Polyp vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)
 C: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17f-Konzentrationen von CD8⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,955$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,955$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)
 D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17f-Konzentrationen von gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

4.4.1.1.3 Zytokin IL-6

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD4⁺-T-Zellen konnte bei IL-6 (Abbildung 25A) ein signifikanter Unterschied zwischen der CRScNP- (2340,45 ± 2043,85 pg/ml) und der Kontrollgruppe (7674,69 ± 6189,07 pg/ml) festgestellt werden. Der Vergleich zur CRSsNP-Gruppe zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich (7674,69 ± 6189,07 pg/ml).

Bei dem Vergleich der Zytokinexpression von IL-6 der Patienten mit CRScNP ergab sich im Vergleich zwischen ortständigen (2670,00 ± 2102,00 pg/ml) und peripheren (3227,00 ± 3488,00 pg/ml) CD4⁺-T-Zellen kein signifikanter Unterschied (p=0,945). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich bei dem Vergleich dieser zwei Gruppen ebenso kein signifikanter Unterschied (NSH 12030,00 ± 9203,00 pg/ml vs. PBMC 169315,00 ± 423437 pg/ml, p=0,375).

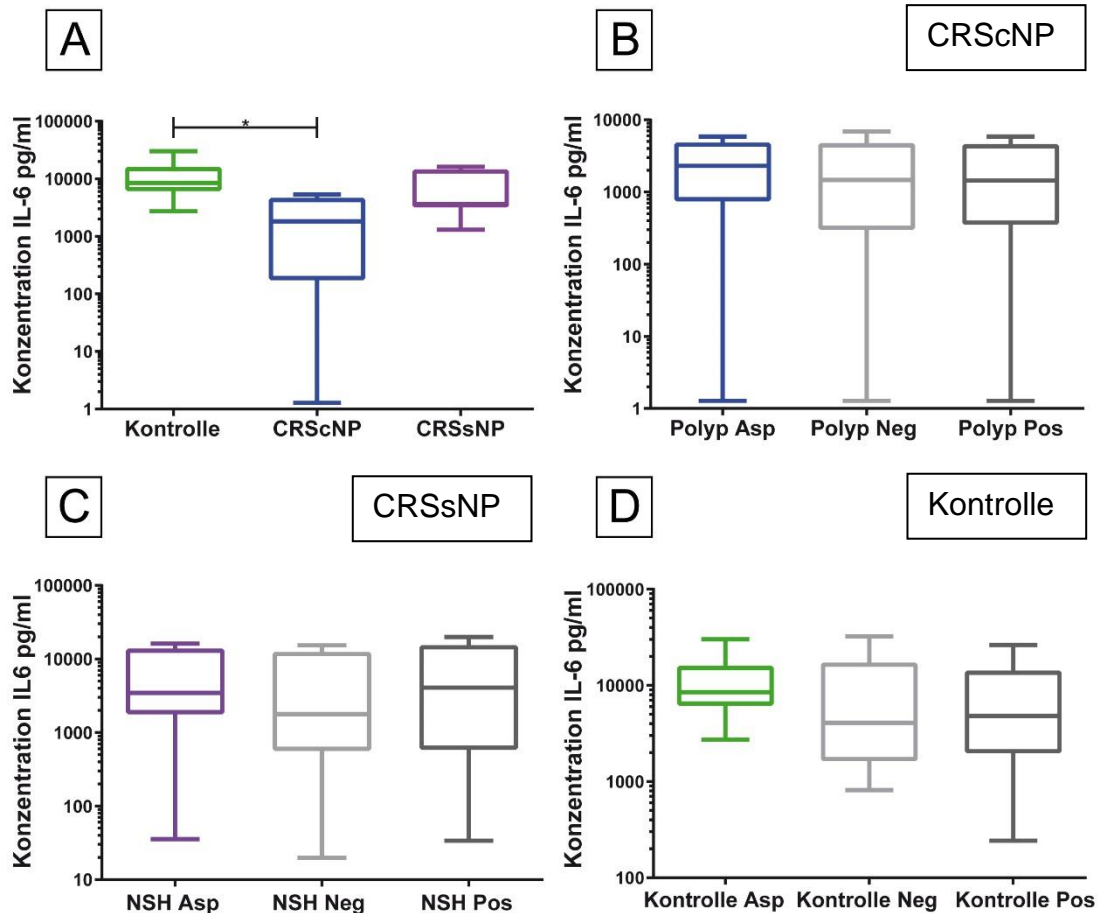


Abbildung 25: Zytokinexpression IL-6 der ortständigen CD4⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Aspergillus

A: signifikant höhere Konzentration von IL-6 der CRScNP- im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,036$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der CRSsNP-Gruppe gegenüber der CRScNP-Gruppe ($p=0,265$) und der Kontrollgruppe ($p=0,265$);

B: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-6-Konzentrationen der CD4⁺ T-Zellen aus Polyp vs. Positivkontrolle ($p=0,946$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,957$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p=0,957$)

C: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-6-Konzentrationen von CD4⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,947$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,947$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle ($p=0,947$);

D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-6-Konzentrationen der CD4⁺ T-Zellen von gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,545$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$);

4.4.1.2 Signifikante Unterschiede im Bereich des Th2 Muster

Bei den gemessenen Zytokinen, die unter das Th2-Zytokinmuster fielen, gab es bei den Zytokinen IL-4 und IL-5 signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Diese werden im Folgenden noch ausführlicher besprochen.

4.4.1.2.1 Zytokin IL-4

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD4⁺-T-Zellen konnte bei IL-4 (Abbildung 26A) ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen der CRScNP- ($2,82 \pm 2,03$ pg/ml) und der CRSsNP ($0,95 \pm 0,53$ pg/ml) sowie der Kontrollgruppe ($0,95 \pm 0,27$ pg/ml) festgestellt werden.

Bei dem Vergleich der Zytokinexpression von IL-4 der Patienten mit CRScNP ergab sich im Vergleich zwischen ortständigen ($3,69 \pm 4,40$ pg/ml) und peripheren ($4,20 \pm 3,66$ pg/ml) CD4⁺-T-Zellen kein signifikanter Unterschied ($p=0,426$). Ebenso ließ sich bei dem Vergleich der zwei Gruppen bei den Patienten mit CRSsNP (NSH $1,03 \pm 0,54$ pg/ml vs. PBMC $1,68 \pm 1,96$ pg/ml, $p=0,25$) und den Patienten aus der Kontrollgruppe (NSH $0,95 \pm 0,27$ pg/ml vs. PBMC $1,19 \pm 0,38$ pg/ml, $p=0,125$) kein signifikanter Unterschied feststellen.

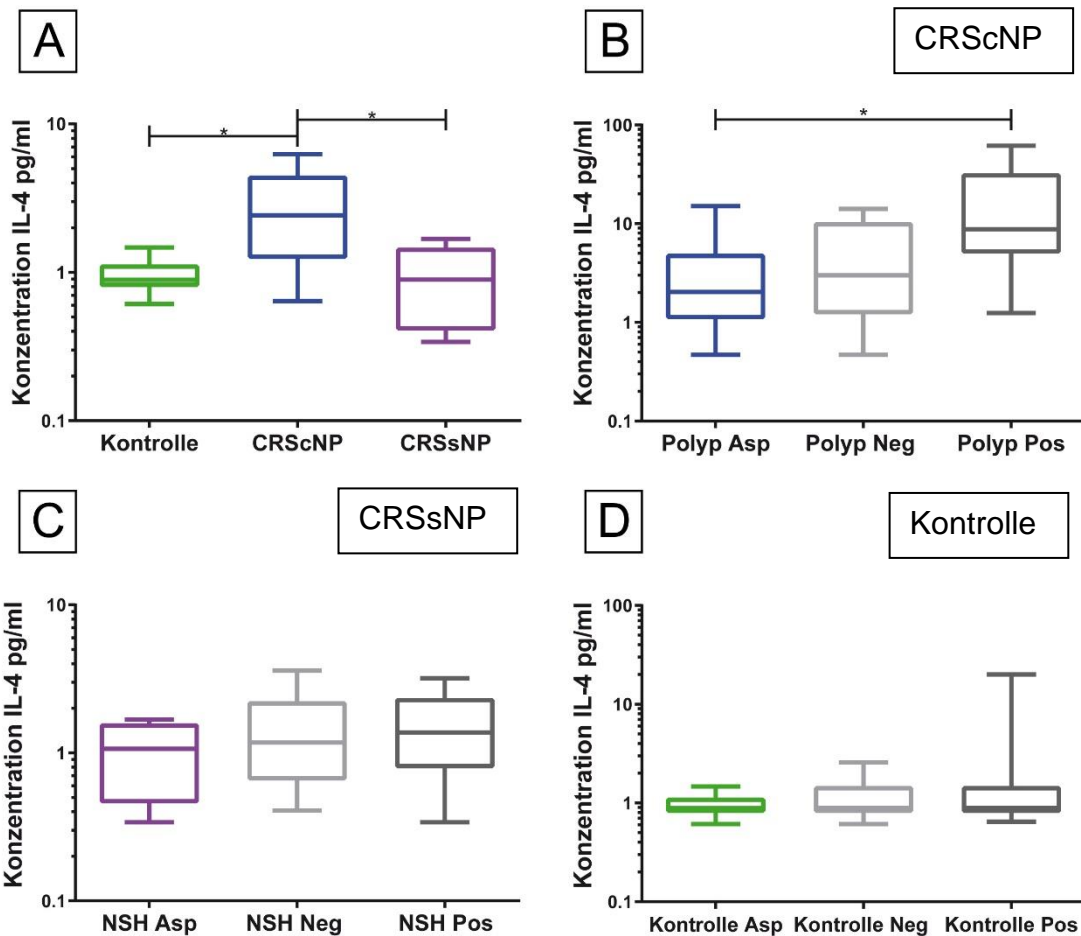


Abbildung 26: Zytokinexpression IL-4 der ortständigen CD4⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Aspergillus

A: signifikant höhere Konzentration von IL-4 der Kontrollgruppe im Vergleich zu der der CRScNP-Gruppe ($p=0,030$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der CRSsNP- gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,992$) und der CRScNP-Gruppe ($p=0,030$)

B: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-4-Konzentrationen von CD4⁺ T-Zellen aus Polyp vs. Positivkontrolle ($p=0,031$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p=0,111$)

C: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-4-Konzentrationen von CD4⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,638$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,638$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p=0,928$)

D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-4-Konzentrationen von gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

4.4.1.2.2 IL-5

Im Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD4⁺-T-Zellen konnte bei IL-5 (Abbildung 27A) ein signifikanter Unterschied zwischen der CRScNP- ($302,53 \pm 315,69$ pg/ml) und der CRSsNP-Gruppe ($9,20 \pm 12,00$ pg/ml) festgestellt werden. Keinen Unterschied gab es im Vergleich zur Kontrollgruppe ($64,77 \pm 127,87$ pg/ml).

Bei dem Vergleich der Zytokinexpression von IL-17f der Patienten mit CRScNP ergab sich im Vergleich zwischen ortständigen ($279,6 \pm 317,60$ pg/ml) und peripheren ($205,5 \pm 217,60$ pg/ml) CD4⁺-T-Zellen kein signifikanter Unterschied ($p=0,496$). Bei der CRScNP-Gruppe zeigte sich bei dem Vergleich dieser zwei Gruppen ein signifikanter Unterschied (NSH $9,01 \pm 11,12$ pg/ml vs. PBMC $85,41 \pm 141,9$ pg/ml, $p=0,016$).

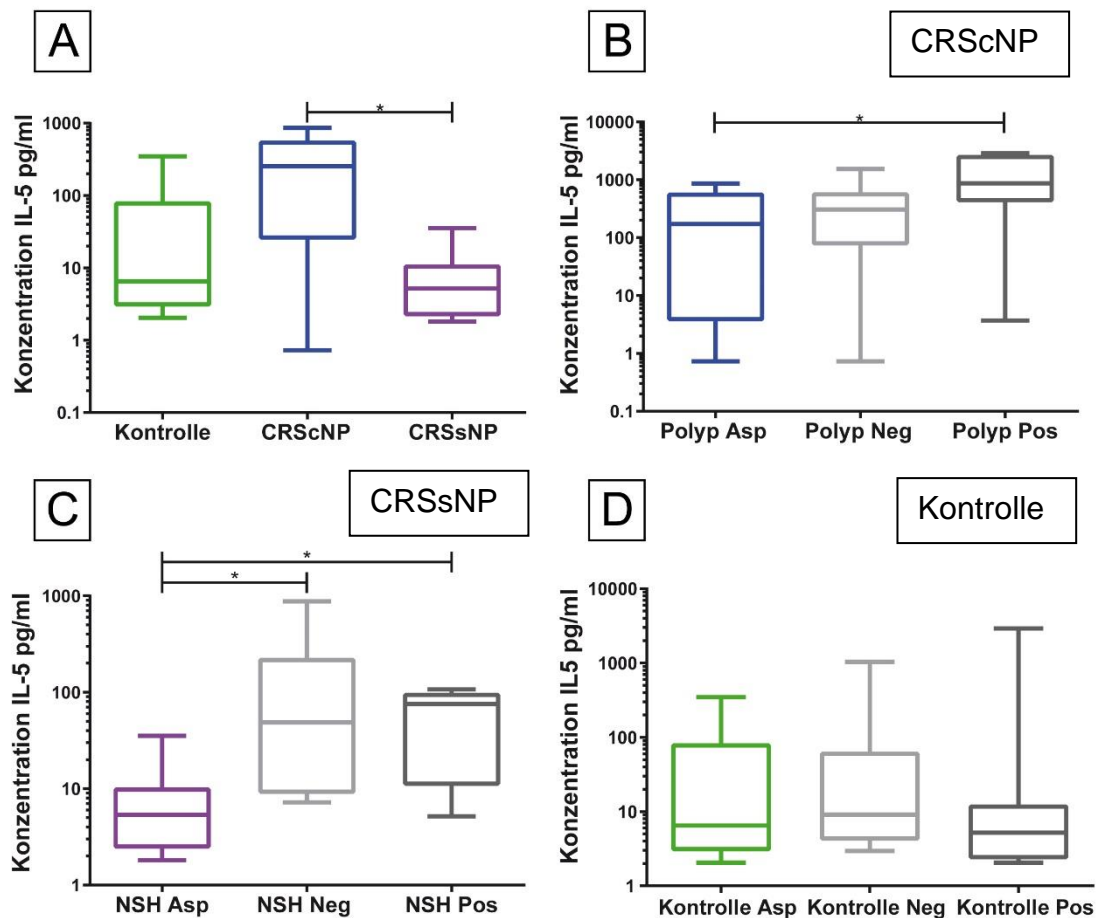


Abbildung 27: Zytokinexpression IL-5 der ortständigen CD4⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Aspergillus

A: signifikant höhere Konzentration von IL-5 der CRScNP- im Vergleich zur CRScNP-Gruppe ($p=0,036$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der Kontrollgruppe gegenüber der CRScNP-Gruppe ($p=0,072$) und der CRScNP-Gruppe ($p=0,604$);

B: signifikant höherer Konzentration von IL-5 der CD4⁺ T-Zellen aus Polyp im Vergleich zur Positivkontrolle ($p=0,043$). Kein Nachweis signifikanter Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle und Polyp ($p>0,999$), sowie der Positivkontrolle ($p=0,175$);

C: signifikant höhere Konzentrationen von IL-5- von CD4⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH im Vergleich zur Positivkontrolle ($p=0,033$) und zur Negativkontrolle ($p=0,021$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle ($p>0,999$);

D: Kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-5-Konzentrationen von gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$);

4.4.2 Zytokinexpression nach Kultur mit *Candida albicans*

Die gemessenen Zytokine nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans* ließen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1/Th17 (Abbildung 28) und Th2 (Abbildung 29) unterteilen. Signifikante Unterschiede wurden je Zytokin im Vergleich der drei Gruppen (CRScNP-, CRSsNP- und Kontrollgruppe) ausgewertet und eingetragen.

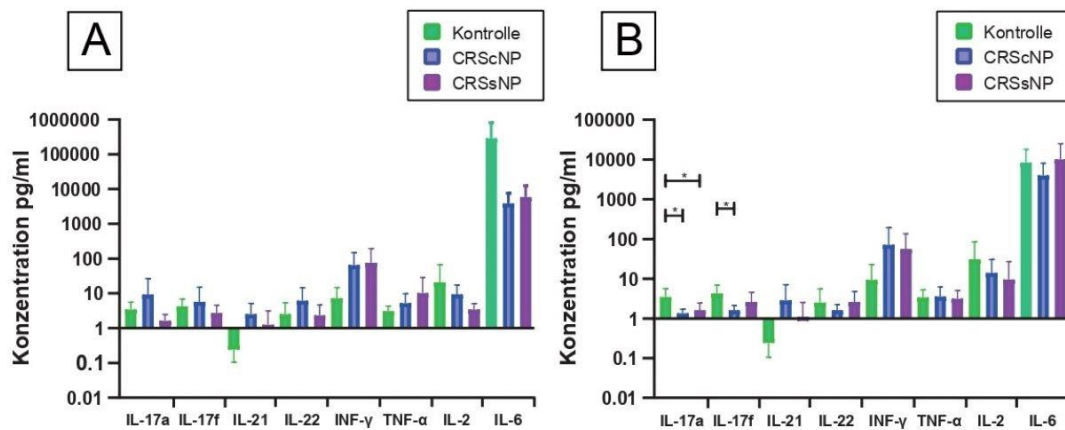


Abbildung 28: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th1/Th17-Musters nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*; A: der CD4⁺-T-Zellen aus dem Gewebe; B: der CD8⁺-T-Zellen aus dem Gewebe

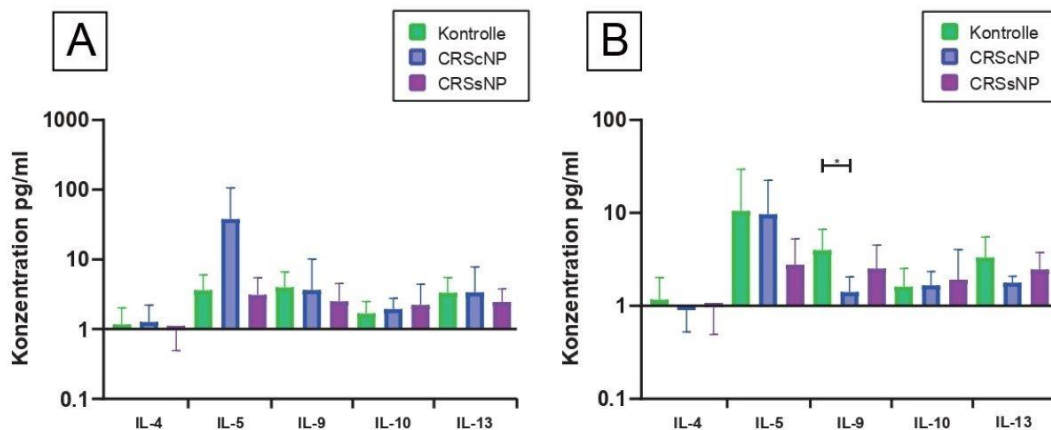


Abbildung 29: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th1/Th17-Musters nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*; A: der CD4⁺-T-Zellen aus dem Gewebe; B: der CD8⁺-T-Zellen aus dem Gewebe

Dabei ließen sich zwischen den einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede nachweisen (Tabelle 9). Diese werden im Folgenden noch ausführlicher besprochen.

Tabelle 9: Bei dem Vergleich der CRScNP-, CRSsNP- und Kontrollgruppe signifikant veränderte Zytokinkonzentrationen nach 6-tägiger Kultur mit C. albicans

	CRScNP		CRSsNP	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Th1/Th17		IL-17a IL-17f		IL-17a
Th2		IL-9		

4.4.2.1 Signifikante Unterschiede im Bereich des Th1/Th17 Musters

Bei den gemessenen Zytokinen, die unter das Th1/Th17-Zytokinmuster fielen, gab es bei den Zytokinen IL17-a und IL17f signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

4.4.2.1.1 Zytokin IL-17a

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD8⁺-T-Zellen konnte bei IL-17a (Abbildung 30A) ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen der Kontrollgruppe ($3,46 \pm 2,16$ pg/ml) und der CRScNP-Gruppe ($1,34 \pm 0,36$ pg/ml) sowie der CRSsNP-Gruppe ($1,62 \pm 0,84$ pg/ml) festgestellt werden.

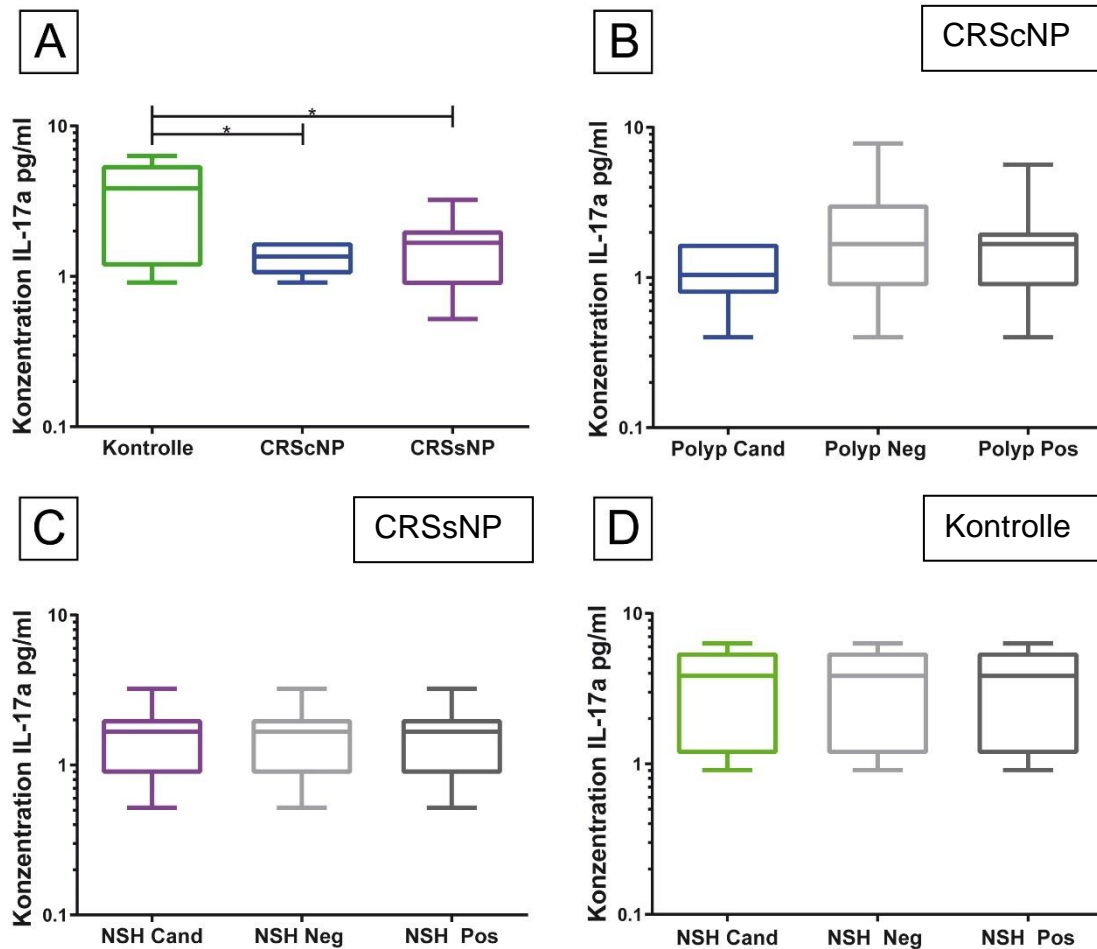


Abbildung 30: Zytokinexpression IL-17a der ortständigen CD8⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit *C. albicans*

A: signifikant höhere Konzentration von IL-17a der Kontrollgruppe- zur CRScNP-Gruppe ($p=0,015$) und zur CRSsNP-Gruppe ($p=0,026$); Keine Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen CRScNP und CRSsNP-Gruppe ($p=0,685$); B: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der CD8⁺ T-Zellen aus Polyp vs. Positivkontrolle ($p=0,482$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,186$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) C: ebenso kein Nachweis signifikanter Unterschiede der CD8⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) D: ebenso kein Nachweis signifikanter Unterschiede der CD8⁺ T-Zellen aus gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

4.4.2.1.2 Zytokin IL-17f

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD8⁺-T-Zellen konnte bei IL-17f (Abbildung 31A) ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen der CRScNP- ($1,61 \pm 0,53$ pg/ml) zur Kontrollgruppe ($4,27 \pm 2,64$ pg/ml) festgestellt werden. Im Vergleich zur CRSsNP-Gruppe ($2,63 \pm 1,93$ pg/ml) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

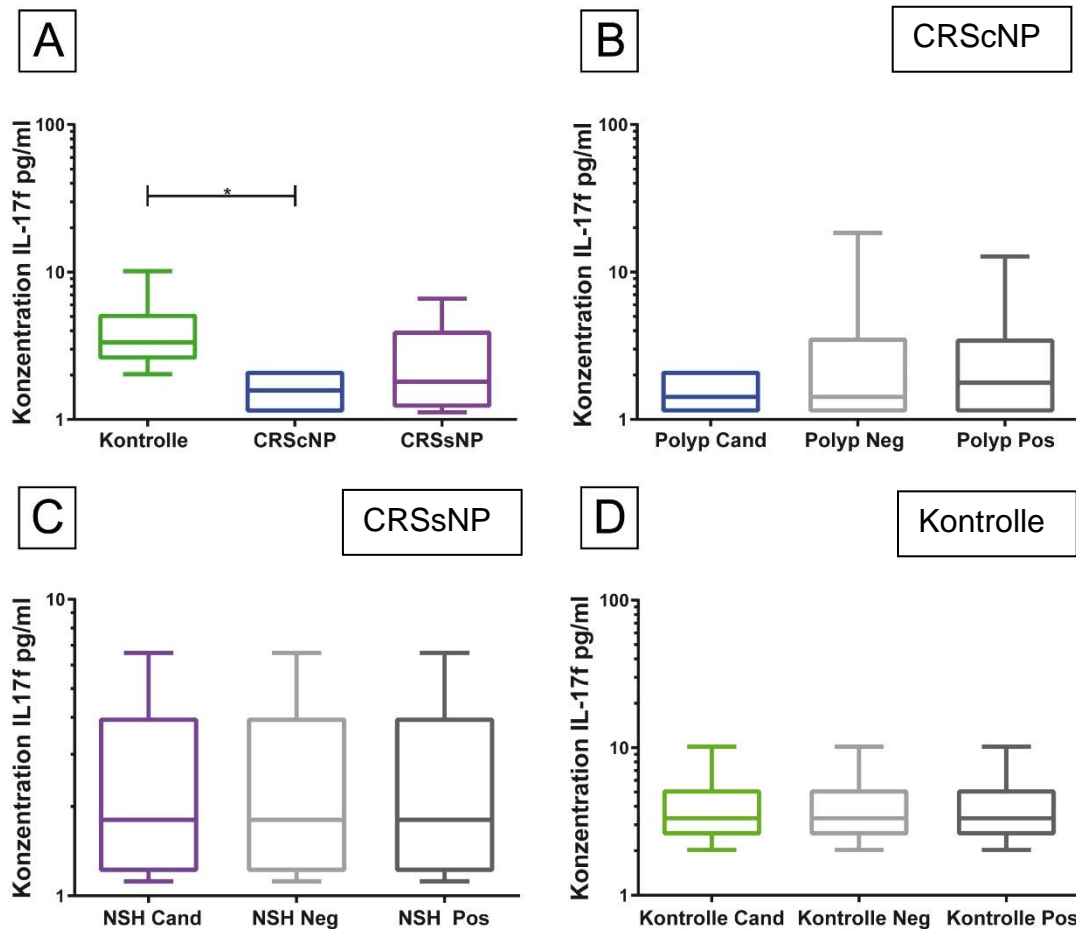


Abbildung 31: Zytokinexpression IL-17f der ortständigen CD8⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Candida

A: signifikant höhere Konzentration von IL-17f der Kontrollgruppe im Vergleich zur CRScNP-Gruppe ($p=0,034$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der CRSSNP-Gruppe gegenüber der CRScNP-Gruppe ($p=0,301$) und der Kontrollgruppe ($p=0,191$);

B: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17f-Konzentrationen der CD8⁺ T-Zellen aus Polyp vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$)

C: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17f-Konzentrationen der CD8⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,955$) und vs. Negativkontrolle ($p=0,955$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle ($p>0,999$);

D: kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-17f-Konzentrationen der CD8⁺ T-Zellen aus gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p>0,999$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$);

4.4.2.2 Signifikante Unterschiede im Bereich des Th2 Musters

Bei den gemessenen Zytokinen, die unter das Th2 Zytokinmuster fielen, gab es bei dem Zytokin IL-9 signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

4.4.2.2.1 Zytokin IL-9

Bei dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen der Überstände von ortständigen CD8⁺-T-Zellen konnte bei IL-9 (Abbildung 32A) ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen der CRScNP- ($1,41 \pm 0,65$ pg/ml) zur Kontrollgruppe ($3,97 \pm 2,66$ pg/ml) festgestellt werden. Im Vergleich zur CRSsNP-Gruppe ($2,52 \pm 1,98$ pg/ml) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

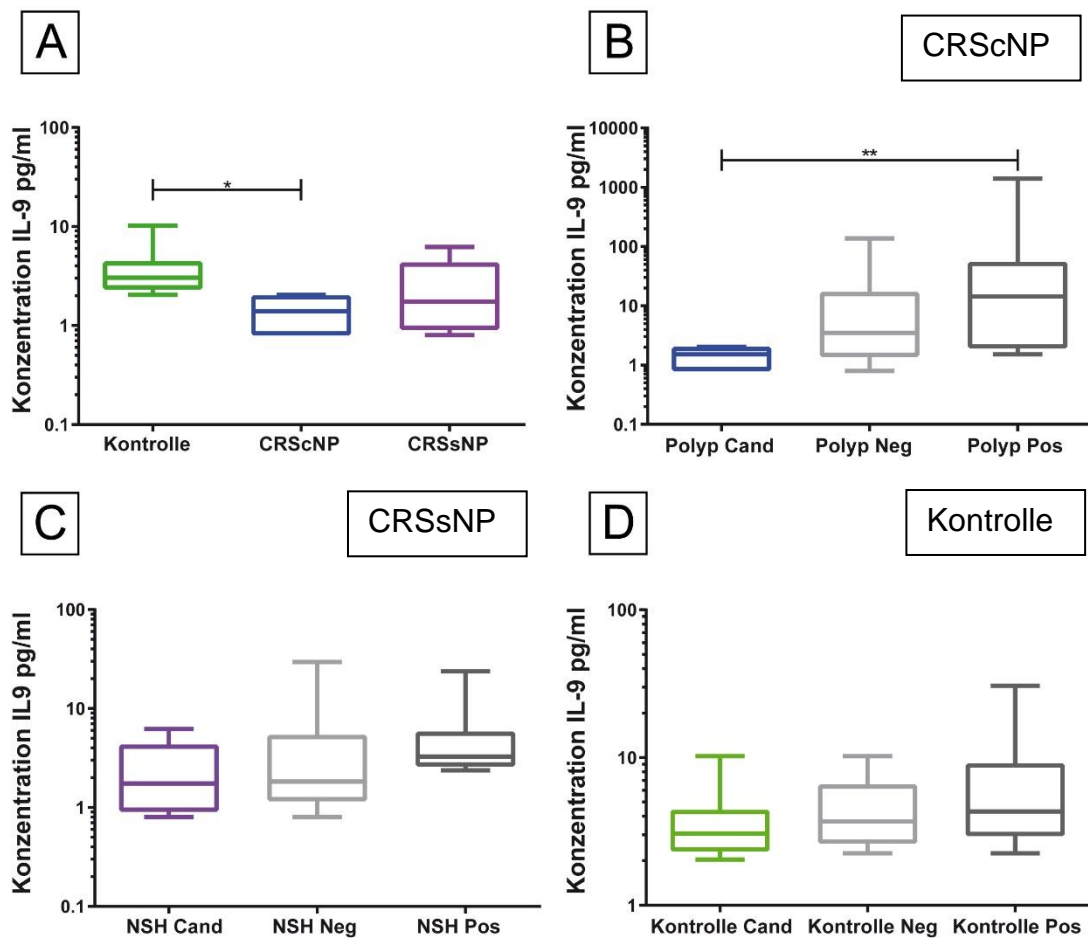


Abbildung 32: Zytokinexpression IL-9 der ortständigen CD8⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Candida

A: signifikant höhere Konzentration von IL-9 der Kontrollgruppe im Vergleich zur CRScNP-Gruppe ($p=0,046$); Keine signifikanten Unterschiede zwischen denen der CRSSNP-Gruppe gegenüber der CRScNP-Gruppe ($p=0,282$) und der Kontrollgruppe ($p=0,282$);
 B: signifikant höhere Konzentration von IL-9 der CD8⁺ T-Zellen der Positivkontrolle gegenüber dem candidaexponierten Polypengewebe ($p=0,003$); Kein Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen Negativkontrolle und candidaexponierten Polypengewebe ($p=0,106$), sowie der Positivkontrolle ($p=0,662$)
 C: Kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-9-Konzentrationen von CD8⁺ T-Zellen aus entzündeter NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,260$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle ($p=0,344$);
 D: Kein Nachweis signifikanter Unterschiede der IL-9-Konzentrationen von gesunder NSH vs. Positivkontrolle ($p=0,583$) und vs. Negativkontrolle ($p>0,999$); Keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Negativkontrolle vs. Positivkontrolle ($p>0,999$);

4.4.3 Subgruppenanalyse

Bei der Messung der Ki67-Aktivität der Zellen konnten innerhalb der CRScNP und der CRSSNP-Gruppe Subgruppen mit hoher Aktivität (Responder) und mit niedriger Aktivität (Nonresponder) identifiziert werden (4.3.3.). Bei der

Zytokinexpression wurden die Ergebnisse dieser Versuche miteinander verglichen.

4.4.3.1 Subgruppen nach Kultur mit *A. fumigatus*

Bei dem Vergleich der Zytokinexpression der Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *A. fumigatus* konnte kein erkennbarer Unterschied zwischen Subgruppen festgestellt werden (Abbildung 33). Ebenso verhielt es sich in den Subgruppen der Patienten mit CRSsNP (Abbildung 34).

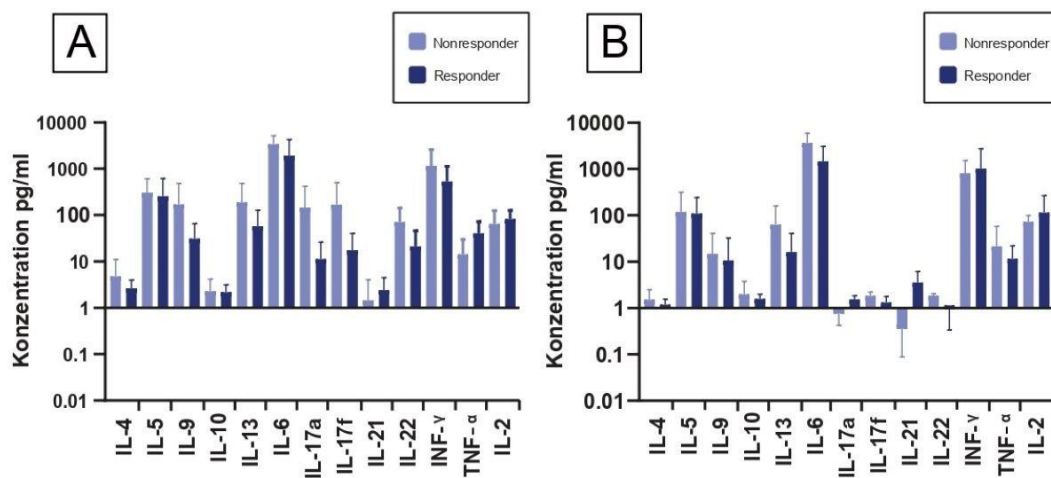


Abbildung 33: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *A. fumigatus*
A: ortständige CD4⁺ T-Zellen; B: ortständige CD8⁺ T-Zellen

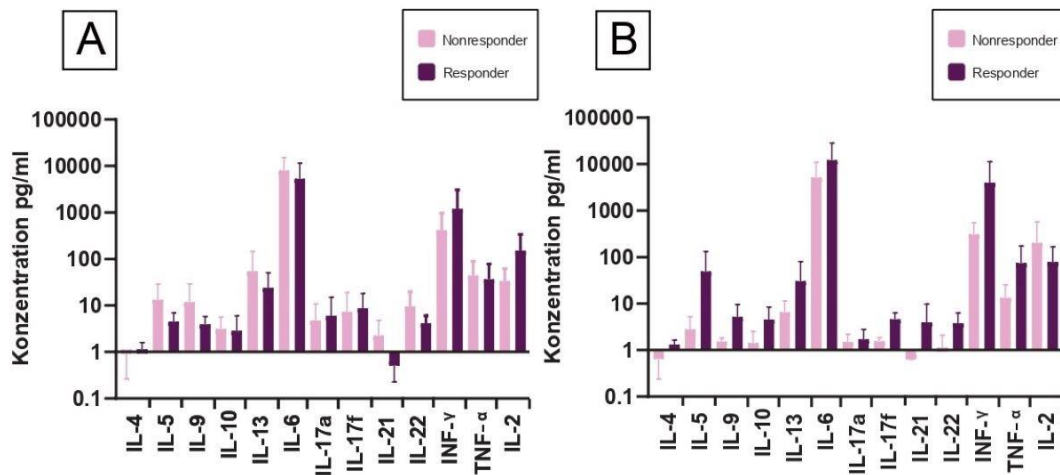


Abbildung 34: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRSsNP nach Kultur mit *A. fumigatus*
 A: ortständige CD4⁺ T-Zellen; B: ortständige CD8⁺ T-Zellen

4.4.3.2 Subgruppen nach Kultur mit *C. albicans*

Bei dem Vergleich der Zytokinexpression der Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *C. albicans* konnte kein erkennbarer Unterschied zwischen Subgruppen festgestellt werden (Abbildung 35). Ebenso verhielt es sich in den Subgruppen der Patienten mit CRSsNP (Abbildung 36).

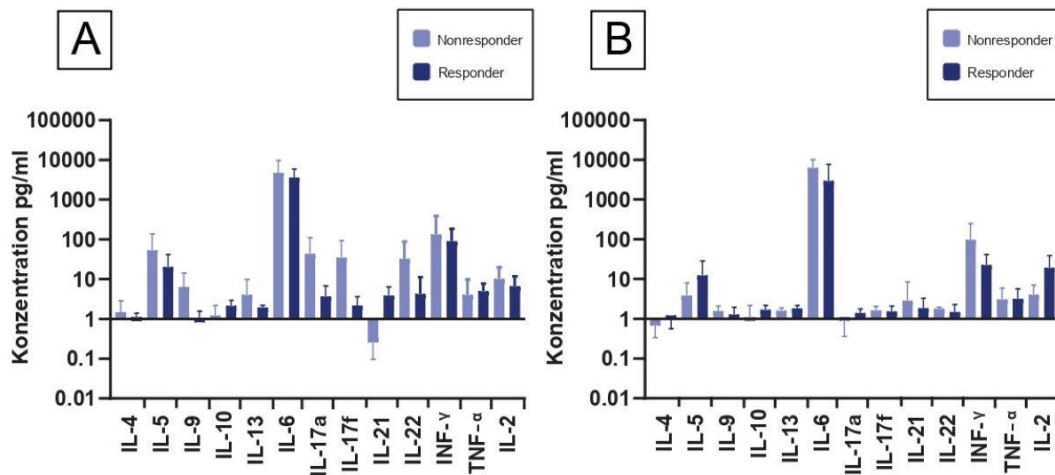


Abbildung 35: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRScNP nach Kultur mit *C. albicans*
 A: ortständige CD4⁺ T-Zellen; B: ortständige CD8⁺ T-Zellen

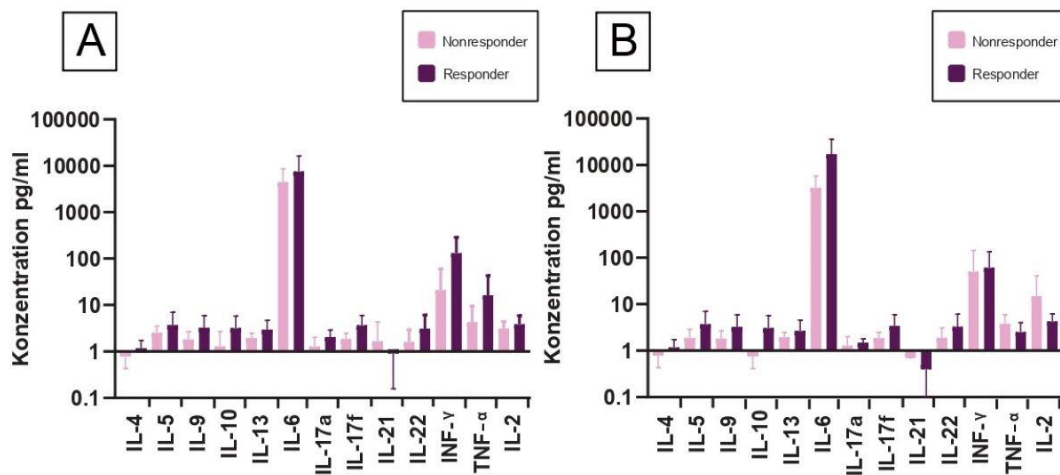


Abbildung 36: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRSsNP nach Kultur mit *C. albicans*
 A: ortständige CD4⁺ T-Zellen; B: ortständige CD8⁺ T-Zellen

5 Diskussion

5.1 Einführung zur Fragestellung

Die chronische Rhinosinusitis ist eine entzündliche Erkrankung, unter der in Europa über 10 % der Erwachsenen leiden. Sie ist gekennzeichnet durch eine starke Einschränkung der Lebensqualität und führt häufig zur Notwendigkeit einer operativen Therapie. Klassisch wird sie anhand des Phänotyps in die CRScNP und die CRSsNP eingeteilt. In letzter Zeit wurden zusätzlich Endotypen, basierend auf dem zu Grunde liegenden Entzündungsprofil, unterschieden. Diese lassen auf verschiedene Krankheitsmechanismen schließen (Schleimer, 2017), dabei gibt es jedoch starke regionale Unterschiede. In Europa findet sich bei CRScNP meist ein Th2-vermitteltes Entzündungsprofil mit hohen Werten von u.a. IL-13 und IL-5 und bei CRSsNP meist ein gemischt Th1/Th2-vermitteltes Profil mit hohen Werten von u.a. IL-1, IL-6 und TNF-α (Könnecke et al., 2018, Vickery and Ramakrishnan, 2017). Die Zytokine des Th1- und Th2-Musters sind gegenreguliert und bewirken eine Hemmung der Proliferation der Zellen, die jeweils das andere Muster produzieren. Die einzelnen T-Zellgruppen unterscheiden sich in der Rolle, die sie beim Schutz der Gesundheit gegenüber exogenen Pathogenen spielen. (Yen et al., 2000).

Die Rolle von Pilzen bei der CRS ist bisher nicht abschließend geklärt.

5.1.1 Besiedelung der Nasenschleimhaut mit Fungi

Die Pilzbesiedelung der Nasenschleimhaut von Patienten mit CRS wird seit langer Zeit kontrovers diskutiert. Bereits 1999 konnten von Ponikau et al. im nasalen Sekret bei 96 % der Patienten mit CRS Pilze nachgewiesen werden (Ponikau et al., 1999). Seine Theorie, dass die Pilze der Hauptgrund für die eosinophile Entzündung bei der CRS sein könnten (Ponikau et al., 1999) zog viele Studien nach sich, die sich mit dem Nachweis von Pilzen in der nasalen Schleimhaut beschäftigten. Jedoch wurden diese auch bei gesunden Probanden nachgewiesen. Lackner et al. konnten bei Neugeborenen bereits nach vier Monate in 94 % positive Pilzkulturen mit einer großen Artenvielfalt beschreiben (Lackner et al., 2005).

Die Studien von Ponikau et al., als auch von Lackner et. al., müssen jedoch kritisch betrachtet werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Standardkultivierungsmethode gewonnen. Viele Erkenntnisse wurden im Laufe der Zeit mit diesen Methoden gesammelt und führten uns zum aktuellen Wissensstand. Jedoch können diese Erkenntnisse nur eingeschränkt Einblick in die *in vivo* Prozesse vermitteln, die an der Krankheit beteiligt sind. Beispielsweise gibt es überlebensfähige Mikroorganismen im Mukus, die unter den Studenumständen eventuell nicht oder nur schwer kultivierbar sind. Ihre Existenz kann durch diese Methode nicht detektiert werden. Es gibt nur wenige Studien, die die nasale Besiedlung von Pilzen mit Hilfe von kulturunabhängigen, molekularen Methoden untersuchten (Hoggard et al., 2017).

So untersuchten Cleland et al. dabei die Pilz-DNA aus nasalen Abstrichen von Patienten mit CRS und einer Kontrollgruppe gesunder Probanden mittels Pyrosequenzierung. Als Ergebnis zeigte sich eine allgegenwärtige Pilzbesiedlung in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied in der Anzahl der gefundenen Spezies (Cleland et al., 2014).

Insgesamt stellen sich bei allen Studien große Unterschiede in den nachgewiesenen Spezies dar. Dies könnte von örtlichen Gegebenheiten am

Wohnort der Patienten, verwendeten Methoden der Studien oder anderen Faktoren abhängig sein. Die wichtigsten Fragen, das heißt, ob die nachgewiesenen Pilze selbst aktiv sind, Bestandteile des normalen Mikrobioms oder lediglich vorübergehende Umweltfaktoren darstellen, bleiben bisher unbeantwortet. Möglich wäre eine weitere Erforschung über alternative Techniken, die zusätzliche Auskunft über die aktive Funktion des Mikrobioms in der CRS geben könnten (Hoggard et al., 2017).

5.1.2 Klinische Hinweise auf die Mitbeteiligung von Pilzen bei der CRS

Ponikau et al. gingen davon aus, dass eine antimykotische Therapie im Rahmen der Behandlung der CRS wirksam sein könnte. Laut dieser Theorie könne durch eine derartige Therapie die Antigenlast gesenkt und die nachgeschaltete Entzündung abgeschwächt werden (Ponikau et al., 2005).

Dies zog viele Studien nach sich, die den Einfluss von Pilzen bei der CRS erforschten. Zunächst ging es um den oben bereits beschriebenen Nachweis von Pilzen in der Nasenschleimhaut. Diese Studien ergaben häufig keine Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit CRS (Cleland et al., 2014). Auch bei der Art der gefundenen Pilze gab es keine Unterschiede zwischen Patienten mit CRS und gesunden Probanden (Murr et al., 2006).

Darauf folgten Studien zum Erfolg einer antimykotischen Therapie im Rahmen der CRS. Bei der Anwendung topischer Antimykotika konnten dabei weder durch Spülungen (Ebbens et al., 2006) noch durch Nasensprays (Weschta et al., 2004) signifikante Erfolge festgestellt werden. Kennedy et al. konnten zudem auch bei der systemischen Therapie keine Verbesserung nachweisen (Kennedy et al., 2005).

Pilze können allerdings eine proteolytische Aktivität besitzen, die die epitheliale Integrität der Patienten mit CRS beeinträchtigen und so die epithelialen Zellen den Pilzelementen direkt ausgesetzt sind. Für eine ursächliche Rolle von Pilzen gibt es trotz Defiziten in der Immunität der CRS Patienten, die ihre Fähigkeit

reduzieren könnten auf Pilze zu reagieren, nicht viele Argumente (Fokkens et al., 2012b).

Auch wenn Antimykotika in den meisten Studien nicht in der Lage sind, CRS adäquat zu behandeln, ist nicht klar, ob sie nicht wirksam sein könnten, wenn die Krankheitsantreiber den Patienten umgebende Pilze aus der Umwelt sind (Schleimer, 2017). Als derartige Pilze liegen *C. albicans* oder *A. fumigatus* als weit verbreitete Umweltpilze nahe.

5.1.3 Aktueller Stand der Wissenschaft

Die Pilzhypothese von Ponikau, in der die ubiquitär vorkommenden Pilze als primäre Ursache der CRS gesehen wurden gilt heute als widerlegt (Fokkens et al., 2012b). Dennoch ist die Frage ungeklärt, ob bestimmte Pilze mit einer krankheitsmodifizierenden Wirkung die Entzündungsreaktion des Körpers im Rahmen der CRS aufrechterhalten und verstärken können (Fokkens et al., 2012b). Shin et al. beschäftigten sich mit dieser These und untersuchten die Proliferation und Zytokinproduktion von peripheren Lymphozyten gesunder und an CRS erkrankter Patienten auf Extrakte von verschiedenen Pilzen, darunter *Alternaria* und *Aspergillus fumigatus*. Es konnte eine verstärkte humorale und zelluläre Reaktion der Patienten mit CRS festgestellt werden, insbesondere bei den Versuchen mit *Alternaria*. Erhöhte IL-5 und IL-13 Werte bei der Kultivierung mit *A. fumigatus* sprechen für eine gesteigerte Immunantwort und eine Beteiligung an der Pathogenese der Erkrankung (Shin et al., 2004). Da diese Versuche allein mit PBMC durchgeführt wurden fehlen bisher Studien über die Entzündungsreaktion auf Pilzantigene bei Patienten mit CRS.

Besonders interessant ist dabei die Rolle der T-Zellen, die im entzündlichen Gewebe von Patienten mit CRS im Vergleich zum gesunden Gewebe vermehrt nachgewiesen werden können (Derycke et al., 2014) und dort proinflammatorische Zytokine produzieren (Hulse et al., 2015). Es konnte bereits festgestellt werden, dass sich die Anzahl an nachweisbaren lebenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen signifikant zwischen peripheren und lokalen T-Zellen von Patienten mit CRScNP unterscheidet (Ickrath et al., 2017). Ebenfalls abweichend könnte sich auch die Aktivität und Zytokinexpression darstellen.

In dieser Arbeit wurde deswegen die Stimulierung peripherer und lokaler T-Zellen von Patienten mit CRS durch die Pilze *A. fumigatus* und *C. albicans* untersucht. Dabei wurde sowohl die Aktivität der T-Zellen als auch deren Zytokinexpression analysiert.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Patientenkollektiv

5.2.1.1 Alter und Comorbidität

Insgesamt gab es starke Schwankungen im Alter der Patienten, deren Gewebe verwendet wurde (zwischen 18-77 Jahren). Besonders der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe lag mit 35 deutlich unter dem der CRS Patienten. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da ein durchschnittliches Erkrankungsalter mit CRS von über 40 Jahren angenommen wird (Schleimer, 2017). Es muss mit einbezogen werden, dass sich Zytokinprofile im zunehmenden Alter verändern können (Busse and Mathur, 2010). Hierdurch kann sich auch die Menge an Zytokinen, die von den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen produziert werden zwischen den verschiedenen Altersgruppen unterscheiden (Yen et al., 2000). Ein weiterer Punkt ist, dass ältere Patienten in der Regel häufiger unter Komorbiditäten leiden als jüngere Patienten, diese können die Pathophysiologie zusätzlich beeinträchtigen (Busse and Mathur, 2010). Hierbei wurden Patienten mit einer bekannten Immunschwäche als Gewebespende ausgeschlossen, dennoch könnten nicht diagnostizierte Krankheiten für unterschiedliche Ergebnisse der Zytokinmessungen eine Rolle spielen.

Ein wichtiger Punkt sind Allergien der Patienten, deren Prävalenz generell in den letzten Jahrzehnten global stark angestiegen ist (Pawankar, 2014). In der Gruppe mit CRScNP hatten 4 von 10 mindestens eine Allergie, mit CRSsNP waren es 4 von 8 und in der Kontrollgruppe 6 von 9 (Tabelle 7).

Umstritten ist bisher die Beziehung zwischen Allergien und CRScNP sowie CRSsNP. Auf der einen Seite werden allergische Erkrankungen, vor allem IgE-vermittelte Entzündungsprozesse, häufig als auslösender oder unterhaltender Faktor bei der CRScNP und CRSsNP angegeben. Ein möglicher Grund ist, dass

durch Allergien Schleimhautentzündungen ausgelöst werden, die zu einer Verengung der Nebenhöhlenostien führen können und eine sekundäre Infektion begünstigen (Marcus et al., 2019). So wird geschätzt, dass bei 75 % der Patienten mit Rhinitis eine Sensibilisierung gegen Umweltallergene vorliegt (Settipane et al., 2013). Es gibt viele Studien, die eine Prävalenz von Allergien bei Patienten mit CRS belegen (Marcus et al., 2019). Es scheint dabei bestimmte Subgruppen zu geben, bei denen die IgE Sensibilisierung eine extrem große Rolle spielt (Settipane et al., 2013). Besonders interessant ist, dass Merkmale der CRScNP wie Eosinophilie, ein Th2-geprägtes Zytokinprofil und erhöhte IgE-Werte auch bei allergischen Bedingungen auftreten können (Marcus et al., 2019).

Auf der anderen Seite gibt es Studien, die bei Patienten mit CRScNP keine Korrelation zwischen der Größe der Polypen sowie der Symptom- und Rezidivrate mit dem Vorhandensein von Allergien nachweisen konnten (Erbek et al., 2007). Auch Shin et al. konnten in der oben beschriebenen Studie im Rahmen der Versuche keine Unterschiede zwischen den Patienten mit Allergien und den Probanden ohne Allergien feststellen (Shin et al., 2004).

Es gibt allerdings eine Untergruppe der CRScNP, die unbestritten häufig an Allergien leidet und erhöhte IgE-Werte im Serum aufweist, die allergische Pilzsinusitis (AFRS) (Hulse et al., 2015). Die AFRS ist definiert als eine Erkrankung mit nicht invasiver lokalisierter überempfindlicher Reaktion auf eine Pilzbesiedelung. Diese tritt besonders in Bereichen mit einer gestörten Mukusdrainage auf (Fokkens et al., 2012b). Patienten mit AFRS zeigen die gleichen Symptome wie Patienten mit generalisierter CRS. Dazu kommt die Produktion von zähem Nasensekret. Diagnostiziert wird die AFRS unter anderem durch den histologischen Nachweis von Pilzen, ohne Anhalt für invasives Wachstum und den Nachweis einer Typ1-Überempfindlichkeit auf Pilze im Prick-Test bzw. durch spezifisches IgE (Ledderose and Leunig, 2012). Patienten mit diagnostizierter AFRS wurden für die Versuche dieser Arbeit ausgeschlossen.

5.2.1.2 Voroperationen

Ein Ungleichgewicht des nasalen Mikrobioms kann die Voraussetzung für einen chronischen Entzündungszustand schaffen. Patienten mit CRS zeigen insgesamt

mit zunehmender Schwere an Entzündung und Eosinophilie im Gewebe eine geringere Vielfalt an Bakterien als gesunde Patienten (Rom et al., 2019). Bei Patienten mit einer Voroperation im Bereich der Nase oder der Nasennebenhöhlen zeigt sich zusätzlich ein signifikanter Rückgang des Mikrobioms der Nebenhöhlen (Cleland et al., 2016). Da die Mikroorganismen einen wichtigen Beitrag zur lokalen Entzündungsreaktion leisten (Cleland et al., 2016), könnten sich Voroperationen und ein verändertes Mikrobiom auch auf die Zytokinsekretion der Immunzellen auswirken. Von den Patienten mit CRSsNP hatten bereits 5 eine Voroperation im Bereich der Nasennebenhöhlen, ein Patient mit CRSsNP und 2 in der Kontrollgruppe.

5.2.1.3 Entnahmeort der Proben

Bei den Patienten mit CRSsNP stammt das Gewebe vom Processus uncinatus, bei den Patienten mit CRSsNP handelt es sich um Polypengewebe aus dem Siebbeinschacht.

In der Kontrollgruppe wurden alle Operationen einbezogen, die an der inneren Nase oder den Nasennebenhöhlen durchgeführt wurden. Durch die unterschiedlichen Entnahmeorte der Kontrollgruppe könnten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Proben ergeben. So können zum Beispiel auch bezüglich des Mikrobioms Unterschiede zwischen den einzelnen Nasennebenhöhlen desselben Patienten nachgewiesen werden (Joss et al., 2015).

5.2.2 Gewinnung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden ausschließlich von Erwachsenen (>18 Jahre) gesammelt. Als schwierig gestaltete sich die Sammlung von gesundem NSH-Gewebe. Die Indikationen für eine nasale Operation ohne das Vorliegen entzündlicher Prozesse sind begrenzt und beschränken sich hauptsächlich auf Patienten nach einem Trauma, mit einer anatomisch bedingten Nasenatmungsbehinderung oder Operationen mit dem Verdacht auf Tumore. Zuletzt genannte Kohorte wurde in dieser Arbeit ausgeschlossen. Wegen der kleinen Anzahl an Operationen und der geringen Menge an gewonnenem

Gewebe war die gesunde NSH der limitierende Faktor bei der Anzahl der angesetzten Versuche.

Zudem ist bereits bekannt, dass in dem Gewebe von Patienten mit CRS, besonders der CRScNP, im Verhältnis zu allen lebenden Zellen mehr CD3⁺ Zellen nachgewiesen werden können als im Gewebe der gesunden Kontrollgruppe (Derycke et al., 2014). Deswegen war die Isolierung einer ausreichenden Menge von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der gesunden NSH häufig nicht möglich. In diesen Fällen erfolgte der Ansatz mit einer verminderten Zellzahl. In Folge dessen wurden die Werte der Zytokinmessung aufmultipliziert. Zusätzlich musste bei Fällen mit sehr niedriger Zellzahl auf die Isotyp-Färbung an Tag 6 verzichtet werden. War die Zellzahl trotz dieser Maßnahmen nicht ausreichend, wurde auf eines der beiden Antigene verzichtet und der Versuch entweder mit *C. albicans* oder *A. fumigatus* durchgeführt. Insgesamt konnten somit 7 Versuche mit *A. fumigatus* und 8 Versuchsansätze mit *C. albicans* unter den 3 Gruppen verglichen werden.

Auch in anderen Studien wurden viele Kontrollproben aufgrund einer nicht ausreichenden Menge an Gewebe ausgeschlossen (Tomassen et al., 2016). Viele Forschungsgruppen, die sich mit der Pathogenese der CRS beschäftigen, führen ihre Versuche deswegen mit dem Mukus von Patienten (Turner et al., 2018) oder ausschließlich mit PBMC durch (Shin et al., 2004). Da in dieser Arbeit das Ziel verfolgt wurde sowohl Erkenntnisse über die lokale als auch die periphere Reaktion von T-Zellen in Kultur mit verschiedenen Pilzantigenen zu sammeln, war diese Vorgehensweise hier nicht möglich.

5.2.3 Zytokinsekretion

Die Lymphozyten aus dem Gewebe sowie die peripheren Lymphozyten aus dem Blut der Patienten wurde bis zum Ansetzen der Versuche kryokonserviert. Dies ist ein bewährtes Vorgehen bei der Aufbewahrung von Zellen und hat keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion (Kreher et al., 2003, Wang et al., 1998). Die Zytokinmessung erfolgte mit dem Legendplex Assay. Hierfür wurde eine Standardkurve durch einen vom Hersteller vorgegebenen Standardcocktail gesetzt. Nur die Werte, die innerhalb der Standardkurve zu liegen kamen,

konnten als valide angesehen werden. Werte, die oberhalb oder unterhalb lagen, wurden für die Auswertung als Grenzwerte der Kurve angenommen, um einen Vergleich zwischen den Gruppen zu ermöglichen. Hierdurch konnten sehr hohe und niedrige Ausschläge zum Teil nicht mit einbezogen werden.

In einem Vorversuch mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus PBMC, die über 6 Tage mit den beiden Antigenen von *A. fumigatus* und *C. albicans* kultiviert wurden, war ein Großteil der Zellen apoptotisch. In einem weiteren Vorversuch wurde durch die Zugabe von IL-2 an Tag 1 eine deutliche Verbesserung des Anteils der vitalen Lymphozyten an Tag 6 erreicht. IL-2 ist für die Differenzierung, Proliferation und das Zellwachstum von Effektor-T-Zellen von großer Bedeutung (Ross and Cantrell, 2018). Diese Zugabe beeinflusst aber die Ergebnisse der Zytokinmessung. So ist bereits lange bekannt, dass IL-2 die Synthese von TNF- α in menschlichen T-Zellen steigern kann (Reem and Yeh, 1984). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass es die Th17 Differenzierung beeinflusst und durch die Zugabe die Produktion von IL-17a und IL-17f gehemmt werden kann (Laurence et al., 2007). Dieser Einfluss wurde für die vorliegenden Versuche eingegrenzt, indem die IL-2 Zugabe ohne Ausnahme zu jedem Ansatz (auch zu den Kontrollen) vorgenommen wurde.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass nicht nur T-Zellen kultiviert wurden, sondern für deren Aktivierung das Hinzufügen von APC aus dem Blut der Patienten notwendig war. Hierfür wurde zunächst PBMC aus dem Blut isoliert und die CD3⁺ Zellen als APC in die Kultivierung übernommen. Für die Messung gilt zu beachten, dass auch diese Zellen in der Lage sind Zytokine zu produzieren. So können von ihnen unter anderem IL-1, IL-6 und TNF- α produziert werden. Eine Produktion von IL-12, IL-4 und IL-23 ermöglicht es den dendritischen Zellen zusätzlich Einfluss auf die Differenzierung der T-Zellen zu nehmen (Kaufmann, 2016). In jedem Ansatz von allen Patienten wurde die gleiche Anzahl an APC hinzugegeben, hierdurch sollte auch deren Produktion an Zytokinen vergleichbar sein.

Zur Standardtherapie der medikamentösen Behandlung der CRS gehören topische Glucokortikosteroide (Stuck et al., 2018). Dies sind

immunmodulatorische Medikamente aus der Klasse der Steroidhormone. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulierung der Prostaglandinausschüttung, die zu einer Unterdrückung der Entzündung führt (Karatzanis et al., 2017). Zudem hemmen sie die Funktion vieler Zellen und humoraler Faktoren (Oakley and Harvey, 2016). Mit Hilfe der Glucokortikoidbehandlung der Patienten mit CRS kann die Schwere der Symptome sowie die Lebensqualität signifikant verbessert werden (Karatzanis et al., 2017).

Für diese Arbeit muss bedacht werden, dass Glucokortikoide auch auf T-Zellen wirken und damit sowohl ihre Funktion hemmen als auch ihre Apoptose induzieren können. So kann die Produktion von IFN- γ , IL-9, IL-4, IL-5 und IL-13 *in vitro*, sowie von Th2 Zytokinen bei Asthma, gesenkt werden. Th17 Zellen und deren Zytokine, v.a. IL-17a und IL-17f sind weniger empfindlich gegenüber einer Hemmung ihrer Produktion (Banuelos and Lu, 2016).

Da eine Operation im Rahmen der CRS erst indiziert ist, sobald die adäquat durchgeführte konservative Behandlung versagt (Stuck et al., 2018), unterscheidet sich die gesunde Kontrollgruppe dieser Arbeit von den mit Glucokortikoiden behandelten Patienten mit CRScNP und CRSsNP. Durch diese Immunsuppression könnte auch die Reaktion auf die Pilzantigene von *A. fumigatus* und *C. albicans* gehemmt sein.

5.2.4 Kultivierungsmethode

In den Versuchen dieser Arbeit werden periphere beziehungsweise lokale T-Zellen ohne den direkten Einfluss von Epithelzellen zusammen mit den APC kultiviert. Dies stellt nicht vollständig die *in vivo* Verhältnisse der Nase bei Patienten mit CRScNP oder CRSsNP dar. Interessant erscheint deswegen, ob eine Kultivierung der T-Zellen in einer Ko-Kultur eindeutigere Ergebnisse liefern könnte.

Für eine Ko-Kultur bieten sich Zellkulturmodelle mit Barrierefunktion an, wie das Air-Liquid Interface (ALI). Hierbei handelt es sich um ein unterteiltes Kultursystem, bei dem die zu kultivierenden Zellen auf einer permeablen Kunststoffmembran ausgesät werden. Nach einer Wachstumsphase wird das

Nährmedium auf der apikalen Seite entfernt, so dass eine Seite der Zellen von Luft umgeben ist. Die Nährstoffversorgung erfolgt bei der anschließenden Kultivierung nur aus dem Medium auf der basolateralen Seite (Chen and Schoen, 2019).

Das Air-Liquid Interface System (ALI) wird häufig für *in vitro* Versuche verwendet, da es die *in vivo* Situation im Körper sehr gut widerspiegeln kann (Ickrath et al., 2019). In einem derartigen System könnte man die Epithelzellen von Patienten mit CRScNP, CRSsNP oder gesunder Nasenschleimhaut im ALI zusammen mit den T-Zellen und den Pilzantigenen im basalen Kompartiment kultivieren. Ein direkter Vergleich der Stimulierung der T-Zellen von Patienten mit CRScNP, CRSsNP und der Kontrollgruppe wäre hiermit unter natürlicheren Bedingungen möglich. Auf Grund der Zytokinexpression der Epithelzellen kann hier auch eine höhere Vitalität der T-Zellen im basalen Kompartiment erreicht werden, ohne zusätzlich IL-2 wie in vorliegenden Versuchen, hinzufügen zu müssen (Ickrath et al., 2019).

Trotz der vielen positiven Effekte einer Ko-Kultur im ALI muss für die Versuche dieser Arbeit bedacht werden, dass sich Schwierigkeiten ergeben könnten. Auf der einen Seite sind durch die räumliche Trennung keine direkten Zell-Zellkontakte zwischen Epithel- und T-Zellen möglich. Auf der anderen Seite produzieren die Epithelzellen selbst auch diverse Zytokine. Dadurch können die Epithelzellen zwar, wie gewünscht, auf die T-Zellen Einfluss nehmen, eine Zytokinmessung nach der Kultivierung würde aber immer Epithel- und T-Zellen gleichzeitig repräsentieren.

5.2.5 Verwendete Antigene

Als Antigene wurden die Peptidmixe von *C. albicans* und *A. fumigatus* verwendet.

Die Peptidmixe sind gut erprobte Antigene, die genau für die *in vitro* Stimulierung von T-Zellen entwickelt wurden und die sich bereits in anderen Versuchen mit T-Zellen aus peripherem Blut bewährt haben (Bacher et al., 2013). Ihre Herstellungsmethode ist standardisiert, gut kontrollierbar und liefert robuste

Ergebnisse. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die T-Zellaktivierung durch die Peptidmixture nicht von der Funktion der Zellen im Organismus abhängig ist.

Die Fähigkeit zur Aktivierung menschlicher T-Zellen wurde zudem in Vorversuchen überprüft. Hierbei wurde über die Ki67-Messung von jedem Antigen die Konzentration bestimmt, bei der die größtmögliche Aktivierung der T-Zellen bewirkt werden konnte. Auch wenn diese Vorversuche nur mit Zellen aus PBMC und nicht aus Gewebeproben angesetzt wurden, sollten die Peptidmixture und die verwendete Konzentration auch für diese gewebständigen T-Zellen als adäquat angesehen werden. Dafür spricht die bei jedem Versuch durchgeführte Messung der Vitalität der Zellen sowie ihre deutlich nachweisbare Aktivierung.

5.2.5.1 Herstellung und Produkteigenschaften

Diese Peptidmixture stellen einen Zusammenschluss aus lyophilisierten Peptiden dar und sind für vorliegende Versuche geeignet, da sie die komplette Sequenz des MP65 *C. albicans*/pmp20 *A. fumigatus* Antigens abdecken. Allgemein stellen MP65 und pmp20 zwei Proteine dar, auf die humane T-Zellen von Spendern mit Immunität gegen *A. fumigatus*/*C. albicans* gut reagierten, wenn man die Proteine zu deren PBMC gab. B-Zellen und Monozyten nehmen die Peptide dabei auf, prozessieren sie und präsentierten sie danach den T-Zellen. Hierdurch können nun diese Proteine für die Stimulierung von *A. fumigatus*/*C. albicans* spezifischen T-Zellen rekombinant hergestellt und als fertige Peptidmixture gekauft und verwendet werden.

5.2.5.2 Alternativen

In Vorversuchen wurde auch ein *A. fumigatus* Lysat von Miltenyi getestet, das gute Ergebnisse lieferte. Für die Herstellung eines Lysats müssen Pilze kultiviert und lysiert werden. Daraus ergeben sich je nach Pilzkultur erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten. Es gibt mehrere Gründe weswegen in den Versuchen dieser Arbeit mit den Peptidmixturen und nicht mit den Lysaten gearbeitet wurde: Ein Punkt ist, dass für die Versuche dieser Arbeit eine große Menge an Antigenen erforderlich war und die Ergebnisse nur bei den Peptidmixturen eindeutig miteinander vergleichbar sind. Ein weiterer Punkt ist, dass bei der Herstellerfirma Miltenyi das *A. fumigatus* Lysat zum Zeitpunkt der

Versuche nicht in ausreichender Menge verfügbar war. Zudem erschien es sinnvoll sowohl bei *C. albicans* als auch bei *A. fumigatus* ein gleichartiges Produkt zu verwenden, um die Ergebnisse bestmöglich miteinander vergleichen zu können.

Eine weitere Alternative zu den verwendeten Peptidmischen stellt eine „Proteinlibrary“ dar. Hierbei werden nicht die Gesamtproteine pmp20/MP65 verwendet, sondern nur die Proteinsequenzen ausgewählt, die die besten Ergebnisse bei verschiedenen Spendern lieferten. Jedoch ist ihre Herstellung im Vergleich zu Peptidmischen weniger gut standardisierbar, die T-Zellen-Aktivierung ist in höherem Maße von der Funktion der Zellen abhängig und die gelieferten Ergebnisse sind weniger robust.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 *Aspergillus fumigatus* als T-Zellaktivator im Rahmen der CRS

5.3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

5.3.1.1.1 Ki67-Aktivität

Bei der Ki67-Aktivität der Zellen konnte zwischen ortständigen und peripheren T-Zellen bei keiner der drei Gruppen (CRScNP, CRSsNP und Kontrollgruppe) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Im Vergleich mit den Positiv- und Negativkontrollen zeigte sich tendenziell eine deutliche Aktivierung der Zellen nach Stimulierung mit *A. fumigatus*. Zwischen den Negativ- und den Positivkontrollen ließen sich bei allen, außer der ortständigen Kontrollgruppe, eine Signifikanz nachweisen.

Bei dem Vergleich der drei Gruppen untereinander gab es bei peripheren Zellen sowie den ortständigen CD8⁺ T-Zellen keine signifikanten Unterschiede. Die Aktivität der CD4⁺ T-Zellen aus dem Gewebe der Patienten mit CRScNP erwies sich signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit CRSsNP.

5.3.1.1.2 Zytokinexpression

Bei CD8⁺-T-Zellen zeigten sich in den Proben der Patienten mit CRS (sowohl mit als auch ohne Polypen) keine signifikant erhöhten Konzentrationen bei den 13

getesteten Zytokinen im Vergleich zu den Proben der gesunden Patienten (Kontrollgruppe). Im Gegenteil: Bei IL-17f war die gemessene Konzentration der Kontrollgruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Konzentration der Patienten mit CRScNP. Im Bereich des Th1/Th17-Musters der CD4⁺ T-Zellen ließ sich bei dem Zytokin IL-17a eine signifikant erhöhte Konzentration bei den Patienten mit CRScNP im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die Konzentrationen von IL-6 waren bei der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Gruppe mit CRScNP. Für das Th2-Zytokinmuster zeigten sich die IL-4 Konzentrationen der Patienten mit CRScNP sowohl zur Kontrollgruppe als auch zu der Gruppe mit CRScNP signifikant erhöht. Die Konzentration von IL-5 erwies sich bei der CRScNP-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur CRScNP-Gruppe. Die Konzentrationen von IL-6 waren bei der Kontrollgruppe signifikant höher als in der CRScNP-Gruppe.

5.3.1.2 Diskussion der Ergebnisse von *A. fumigatus*

Die Ergebnisse der Ki67 Aktivität zeigen eine deutliche Aktivierung der Zellen nach Kultur mit *A. fumigatus*. In der lokalen Kontrollgruppe gab es starke Schwankungen, weswegen bei dem Vergleich der Positiv- und Negativkontrollen keine signifikanten Unterschiede zueinander nachgewiesen werden konnten. Die Vergleichbarkeit zu den Proben mit CRS war deswegen nur bedingt gegeben. Gründe hierfür können in einer zu niedrigen Zellzahl, zu wenig Proben und dem unterschiedlichen Alter der Patienten liegen. Bei den Patienten mit CRScNP und CRScNP zeigten sich zudem starke Unterschiede in der Aktivierung. So gab es einige Versuche, bei denen die T-Zellen sehr stark auf die Stimulierung ansprachen, bei anderen Versuchen konnte dies nicht festgestellt werden. Das lässt sich damit erklären, dass nur bestimmte Untergruppen des Phänotyps auf die Stimulierung reagieren und andere weniger beeinflusst werden können.

Interessant ist dabei auch die Rolle der Th17 Zellen im Rahmen der CRS. Diese Zellen produzieren vorwiegend IL-17a, IL-17f, IL-22 und IL-21. IL-17a und IL-17f bewirken dabei eine Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. In den Atemwegen kann IL-17a für die Freisetzung von Chemokinen sorgen, die eine Hochregulierung von neutrophilen und fungiziden

Peptiden bewirken (Miljkovic et al., 2017). Obwohl IL-17a sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen produziert werden kann (Hizawa et al., 2006), wurde in den vorliegenden Versuchen nur ein Unterschied bei den CD4⁺ T-Zellen festgestellt. Das spricht dafür, dass nur die CD4⁺ T-Zellen der Patienten mit CRScNP durch die Aspergillus Antigene aktiviert werden. Bei IL-17f ließ sich keine Reaktion in den Zellen der Patienten mit CRS nachweisen. CD8⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe zeigten sogar eine stärkere Expression als die Zellen der Patienten mit CRS, jedoch bewegten sich die Werte von allen drei Gruppen bei IL-17f in einem sehr niedrigen Rahmen (< 10 pg/ml), weswegen deren Relevanz eher zu vernachlässigen ist.

IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und dem Fortschreiten von Entzündungen. Es kann zudem Zellproliferation und Gewebeschäden induzieren (Bequignon et al., 2020). Bei den CD4⁺ T-Zellen wurde durch Stimulierung mit *A. fumigatus* die Produktion von IL-6 der Kontrollgruppe gegenüber den Patienten mit CRScNP signifikant erhöht. Zudem war die Konzentration von IL-6 im Vergleich zu den anderen Zytokinen extrem hoch. Dies ist durch zwei Faktoren erklärbar: Eine hohe IL-17a-Konzentration hat eine vermehrte Produktion von IL-6 zur Folge (Miljkovic et al., 2017), zudem kann IL-6 auch durch die APC freigesetzt werden.

IL-4 zählt zu einem der Schlüsselzytokine der Th2-gesteuerten Entzündung bei Patienten mit CRScNP (Bachert et al., 2016). Es wurde bereits häufiger darüber berichtet, dass das Epithel, als erste Barriere des Immunsystems gegen Pathogene, bei Patienten mit CRScNP Störungen aufweisen kann. Werden die Epithelzellen vermehrt mit IL-4 konfrontiert, so kommt es zu einer Erhöhung der Permeabilität und einem erleichterten Eindringen von Antigenen durch das Epithel (Wise et al., 2014). Zur Behandlung der CRScNP ist, als einziger humaner monoklonaler Antikörper, inzwischen Dupilumab zugelassen (Fokkens et al., 2020). Dupilumab ist ein Antikörper gegen IL-4 und IL-13 und wurde bereits seit längerem bei der Behandlung von Th2-gesteuerten Krankheiten wie Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis eingesetzt. Als Unterstützung zur konservativen Standardtherapie kann er bei Patienten mit CRScNP zu deutlichen klinischen, endoskopischen und radiologischen Verbesserungen führen (Bachert

et al., 2016). Zudem kann hierdurch die operative Behandlungsnotwendigkeit sowie die Notwendigkeit für eine systemische Kortikosteroidbehandlung deutlich gesenkt und eine verringerte Polypengröße bewirkt werden (Bachert et al., 2019). Auch in den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich IL-4 bei Patienten mit CRScNP signifikant erhöht gegenüber den beiden anderen Gruppen. Diese erhöhte Produktion von IL-4 spricht für die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen nach Exposition mit *A. fumigatus*

IL-5 gilt bei Patienten mit CRScNP als das Leitzytokin der eosinophilen Entzündung (Bachert et al., 2010). Tomassen et al. zeigten bereits, dass die Konzentration von IL-5 mit dem Phänotyp und der Komorbidität mit Asthma in Verbindung gebracht werden kann. So konnte bei hohen IL-5-Spiegeln eine Prävalenz mit CRScNP und Asthma bronchiale festgestellt werden. Bei niedrigen IL-5 Spiegeln gab es wiederum eine Prävalenz zu CRSsNP (Tomassen et al., 2016). Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte in klinischen Studien bereits die Notwendigkeit von Revisionsoperationen bei Patienten mit CRScNP durch Gabe von IL-5-Antikörpern gesenkt werden (Bachert et al., 2017). Dadurch eröffnete sich eine neue Behandlungsmöglichkeit und derzeit laufen mit Mepolizumab Phase III Studien zur Behandlung der CRScNP (Lavigne and Lee, 2018). Bei den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich der IL-5 Spiegel von CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit CRScNP im Vergleich zu den Patienten mit CRSsNP signifikant erhöht. Dies spricht dafür, dass die Zellen bei CRScNP durch die Exposition mit Aspergillus aktiviert wurden. Dies würde in der Folge zu einer Verstärkung der eosinophilen Entzündung führen.

Es ist bereits bekannt, dass bei Patienten mit CRScNP eine Hochregulierung der IL-5 und IL-4-Spiegel festgestellt werden kann (Könnecke et al., 2018). Die in den Versuchen dieser Arbeit erhöhten Werte von IL-4 und IL-5 bei CRScNP müssen deswegen kritisch betrachtet werden. Interessant ist die Frage, ob diese Unterschiede auch unabhängig von der Pilzkultivierung auftreten. Dagegen spricht, dass bei der Kultivierung mit *C. albicans* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit CRScNP und mit CRSsNP nachgewiesen werden konnten.

5.3.2 *Candida albicans* als T-Zellaktivator im Rahmen der CRS

5.3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Kultur mit *C. albicans*

5.3.2.1.1 Ki67-Aktivität

Bei der Ki67-Aktivität konnte zwischen peripheren und ortständigen T-Zellen nur bei dem Vergleich der CD8⁺ T-Zellen der Patienten mit CRSsNP ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Positiv- und Negativkontrollen der Patienten mit CRScNP und CRSsNP zeigten sich zueinander signifikant. Ebenso signifikant war der Unterschied zwischen den Proben nach der Kultur mit Aspergillus und der Positivkontrolle. Zur Negativkontrolle konnte dabei nur tendenziell ein Unterschied erkannt werden.

Positiv- und Negativkontrollen der Kontrollgruppe waren nur bei den peripheren Zellen zueinander signifikant, im Bereich der ortständigen T-Zellen konnte keine Signifikanz gezeigt werden.

Bei dem Vergleich der drei Gruppen gab es weder bei den ortständigen noch bei den peripheren Zellen signifikante Unterschiede.

5.3.2.1.2 Zytokinexpression

Signifikante Unterschiede gab es bei den CD8⁺-T-Zellen sowohl im Bereich des Th1/Th17-Musters (IL-17a und IL17f), als auch im Bereich des Th2-Musters (IL-9). Jedoch zeigen sich dabei keinesfalls die Proben der Patienten mit chronischer Rhinosinusitis erhöht, sondern die der gesunden Patienten aus der Kontrollgruppe.

5.3.2.2 Diskussion der Ergebnisse von *C. albicans*

Th17 Zellen sind besonders involviert in die Abwehr von Bakterien und Pilzen (Brucklacher-Waldert et al., 2009) und spielen eine große Rolle im adaptiven Immunsystem. Sie lösen eine Entzündung nach einer Infektion aus, vor allem gilt dies bei *C. albicans* (Miljkovic et al., 2017). Eine Erhöhung dieser Zytokine wäre deswegen ein Hinweis für eine Aktivierung durch *C. albicans*. Da bei den vorliegenden Versuchen eine solche Erhöhung nicht nachweisbar war und sich

bei IL-17a und IL-17f sogar die Konzentration der CD8⁺ T-Zellen der Kontrollgruppe signifikant höher darstellten, gibt es keinen Nachweis einer Aktivierung der T-Zellen bei CRS durch *C. albicans*.

Bei IL-9 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. IL-9 wird von verschiedenen Zellen produziert, unter anderem den Th2 und Th17 Zellen, und beeinflusst die Genexpression der Epithelzellen, in deren Folge es zu Veränderungen der Becherzellen kommen kann. Zudem ist IL-9 an der Differenzierung der Th17 Zellen beteiligt (Olcott et al., 2016). Auch bei IL-9 ließ sich bei den CRS Patienten keine gesteigerte Produktion durch die Stimulierung von *C. albicans* nachweisen. Die Kontrollgruppe der CD8⁺ T-Zellen war außerdem signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit CRScNP.

5.4 Fazit und Ausblick

Herrschen für Pilze optimale Bedingungen, kann man in der Schleimhaut der Nase und der Nasennebenhöhlen bei annähernd jedem Individuum - eingeschlossen auch alle CRS Patienten - Pilze identifizieren (Ebbens and Fokkens, 2008). Interessant erscheint dabei, ob diese Pilze selbst aktiv oder normale Bestandteile des Mikrobioms sind (Hoggard et al., 2017). Auch *A. fumigatus* und *C. albicans* lassen sich sehr oft in der NSH nachweisen (Braun et al., 2003, Jiang et al., 2005), doch ihre Rolle bei der Pathophysiologie der CRS wurde bisher nicht ausgiebig erörtert und sollte in dieser Arbeit näher erforscht werden.

5.4.1 Fazit aus den Versuchen mit *Aspergillus fumigatus*

Bei *A. fumigatus* konnte eine Stimulierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen über die Ki67-Aktivität nachgewiesen werden. Responder und Nonresponder waren bei CRScNP und CRSSNP noch eindeutiger zu erkennen als bei den Versuchen mit *C. albicans*.

Bei den Ergebnissen der Zytokinexpression kam es mit *Aspergillus fumigatus* zu einer signifikant vermehrten Produktion von IL-17a, IL-4 und IL-5 bei CRScNP im Bereich der CD4⁺ T-Zellen. Diese T-Zellen werden durch die Stimulierung durch

A. fumigatus angeregt dieses gemischte Th2/Th17 Zytokinmuster vermehrt zu produzieren.

Insgesamt zeigen sich starke Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen. Bei den Ergebnissen der Ki67-Aktivität ließ sich eine Gruppe an Versuchen identifiziert, die besonders stark durch *A. fumigatus* aktiviert wurden. Diesen Unterschieden könnte eine Superantigeneigenschaft von *A. fumigatus* zu Grunde liegen.

Superantigene sind Toxine, die T-Zellen antigenunspezifisch stimulieren können. Dabei kann es je nach Superantigen zu einer oligoklonalen Aktivierung von 4-20 % aller T-Lymphozyten kommen. Übliche Antigene sind dazu nicht in der Lage und können nur einen deutlich kleineren Prozentsatz an T-Zellen aktivieren. Auf die Stimulierung mit Superantigenen reagieren T-Zellen mit einer massiven Zytokinausschüttung. Als besonders stark exprimierte Zytokine zeigen sich hierbei unter anderem TNF- α , INF- γ , IL-1, IL-2 oder IL-6 (Rink et al., 2012). Bei der CRScNP wurde die Enterotoxine von *S. aureus* als Superantigene identifiziert (Vickery et al., 2019). Erforscht wurde seine Rolle in Folge seines gehäuften Vorkommens in der NSH von Patienten mit CRScNP (Van Zele et al., 2004). Die von ihm produzierten Toxine sind potente T-Zellaktivatoren und führen sowohl zu einer unkoordinierten, übermäßigen T-Zellantwort als auch zu einer B-Zellproliferation, die eine gesteigerte Produktion von IgE und eine eosinophile Entzündung bewirkt. Zusätzlich kommt es zu einer gesteigerten Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13. Diese Reaktion des Körpers auf *S. aureus* treibt die Entzündung im Rahmen der CRScNP weiter an (Vickery et al., 2019).

5.4.2 Fazit aus den Versuchen mit *Candida albicans*

Eine Stimulierung der Zellen der Patienten mit CRS durch *C. albicans* konnte über die Ki67-Aktivität nachgewiesen werden. Dabei gab es Patienten, die besonders auf die Stimulierung ansprachen (Responder) und einige, die darauf weniger reagierten (Nonresponder). Dies zeigte sich sowohl bei den Patienten mit CRScNP als auch bei den Patienten mit CRSsNP.

Bei der Messung der Zytokinexpression wurden weder bei CRScNP noch bei CRSsNP Anzeichen für eine vermehrte Produktion von Zytokinen festgestellt. Deswegen lässt sich schlussfolgern, dass *C. albicans* als T-Zellstimulator bei CRS eher vernachlässigt werden kann.

5.4.3 Ausblick

Durch das Ausschließen von *C. albicans* als T-Zellstimulator bei Patienten mit CRS sollten zukünftige Versuche mit *A. fumigatus* angesetzt werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit mehr gesunde Gewebeproben als Kontrollgruppe zu nutzen, sowie eine höhere Anzahl an T-Zellen für die Versuche einzusetzen. Daraus könnten eindeutiger Ergebnisse gewonnen werden. Zudem wäre eine kritischere Auswahl des Patientenkollektivs möglich.

In dieser Arbeit war die Versuchsanzahl nicht ausreichend, um die Superantigeneigenschaften von *A. fumigatus* auch in einer Subgruppenanalyse der Zytokinexpression hinreichend analysieren zu können. Sicher ist aber, dass *A. fumigatus* bei einigen Probanden mit CRScNP eine Entzündung durch vermehrte Stimulation lokaler T-Zellen aufrechterhalten kann.

Untersuchungen zu Superantigeneigenschaften von *A. fumigatus* auf T-Zellen von Patienten mit CRS sollten weiterverfolgt werden. Durch die oben genannten Maßnahmen können in folgenden Versuchen auch bei der Zytokinexpression aussagekräftige Versuche in der Responder Gruppe gesammelt werden. Bei Bestätigung der Ergebnisse könnte hier ein zielgerichteter Therapieansatz der CRS erfolgen, um der gesteigerten lokalen Entzündungsreaktion entgegenzuwirken.

CRS ist eine heterogene Krankheit, mit hoher Prävalenz, hohen Kosten und starken Auswirkungen auf die Lebensqualität (Schleimer, 2017). Gerade deswegen ist es wichtig in weiteren Studien zu erforschen, wie genau *A. fumigatus* auf die Stimulierung von T-Zellen der Patienten mit CRS Einfluss nimmt und wie man zukünftig mittels einer medikamentösen Behandlung gegenwirken kann.

6 Zusammenfassung

Die chronische Rhinosinusitis (CRS) ist eine entzündliche Erkrankung der Nase und Nasennebenhöhlen mit einem Bestehen von Symptomen über zwölf Wochen im Jahr. In Europa sind über 10% der erwachsenen Bevölkerung von ihr betroffen und leiden unter einer stark verminderten Lebensqualität. Nach dem Phänotyp lassen sich zwei Formen unterscheiden: die chronische Rhinosinusitis mit Polypen (CRScNP) und ohne Polypen (CRSsNP). Meist wird unter europäischen Probanden bei der CRScNP eine hauptsächlich eosinophile Th2-vermittelte und bei der CRSsNP ein gemischtes Profil aus Th1/Th17/Th2-vermittelter Entzündung beschrieben. Doch dies erfasst nicht die Vielfalt dieser Erkrankung. Erst kürzlich konnten Endotypen, basierend auf der Zytokinsekretion, identifiziert werden, die auf ein multifaktorielles Geschehen schließen lassen. Nachdem im Nasensekret von über 90% der CRS Patienten Pilze nachgewiesen werden konnten erscheint es wichtig, deren Rolle in der Pathogenese der CRS zu ergründen. Besonders interessant sind dabei *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans*. Als opportunistische Pilze könnten sie im Rahmen der CRS in der Lage sein bei einigen Endotypen durch eine verstärkte Aktivierung von Immunzellen die lokale Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten.

Es wurden lokale und periphere CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Patienten mit CRScNP, CRSsNP und einer gesunden Kontrollgruppe isoliert. Eine Kultivierung mit den Antigenen von *C. albicans* und *A. fumigatus* erfolgte in einer Konzentration von 1 µg/ml über 6 Tage. Im Anschluss daran wurden die Zellen für das Durchflusszytometer angefärbt und ihre Aktivität über die Ki67⁺ Expression gemessen. In den Überständen der Kultivierung wurde durch das Durchflusszytometer mittels Multiplexassay die produzierten Zytokinkonzentrationen der Zellen bestimmt.

In dieser Arbeit konnte eine Stimulierung der lokalen und peripheren T-Zellen durch die beiden Antigene gezeigt werden. *C. albicans* ist jedoch nicht in der Lage die Zytokinproduktion der Zellen signifikant zu erhöhen. *Aspergillus fumigatus* jedoch kann die Zytokinexpression der lokalen CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit CRScNP bei IL-17a, IL-4 und IL-5 signifikant steigern. Die in diesen

Versuchen gleichzeitige Erhöhung von den Zytokinen IL-17f und IL-6 sowie der Nachweis, dass es Patienten gibt, die mehr oder weniger stark auf die Stimulierung reagieren sollten in zukünftigen Versuchen weiterverfolgt werden. Sicher ist, dass es eine Untergruppe bei den Patienten mit CRScNP gibt, die auf die Anwesenheit von *A. fumigatus* durch eine verstärkte Entzündungsreaktion und Zytokinproduktion reagieren. Hierbei könnte *A. fumigatus* als Superantigen bei einigen Patienten mit CRScNP wirken. Um den Einfluss von *A. fumigatus* auf diese bestimmten Endotypen detaillierter beschreiben zu können sind weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Versuchen und einer höheren Zellzahl nötig.

Häufig kommt es bei Patienten mit CRS, trotz nach derzeitigem Stand adäquat durchgeführter chirurgischer und medikamentöser Behandlung, zu persistierenden Beschwerden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Charakterisierung ihrer Endotypen noch nicht endgültig erforscht ist. Deswegen werden dringend Antworten gebraucht, um neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können. *A. fumigatus* als T-Zellstimulator ist dabei bei einigen Subgruppen der CRScNP von hoher Bedeutung.

7 Literaturverzeichnis

- BACHER, P., SCHINK, C., TEUTSCHBEIN, J., KNIEMEYER, O., ASSENMACHER, M., BRAKHAGE, A. A. & SCHEFFOLD, A. 2013. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J Immunol*, 190, 3967-76.
- BACHERT, C., GEVAERT, P., HOLTAPPELS, G., JOHANSSON, S. G. & VAN CAUWENBERGE, P. 2001. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 107, 607-14.
- BACHERT, C., GEVAERT, P., HOWARTH, P., HOLTAPPELS, G., VAN CAUWENBERGE, P. & JOHANSSON, S. G. 2003. IgE to Staphylococcus aureus enterotoxins in serum is related to severity of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 1131-2.
- BACHERT, C., HAN, J. K., DESROSIERS, M., HELLINGS, P. W., AMIN, N., LEE, S. E., MULLOL, J., GREOS, L. S., BOSSO, J. V., LAIDLAW, T. M., CERVIN, A. U., MASPERO, J. F., HOPKINS, C., OLZE, H., CANONICA, G. W., PAGGIARO, P., CHO, S. H., FOKKENS, W. J., FUJIEDA, S., ZHANG, M., LU, X., FAN, C., DRAIKIWICZ, S., KAMAT, S. A., KHAN, A., PIROZZI, G., PATEL, N., GRAHAM, N. M. H., RUDDY, M., STAUDINGER, H., WEINREICH, D., STAHL, N., YANCOPOULOS, G. D. & MANNENT, L. P. 2019. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet*, 394, 1638-1650.
- BACHERT, C., MANNENT, L., NACLERIO, R. M., MULLOL, J., FERGUSON, B. J., GEVAERT, P., HELLINGS, P., JIAO, L., WANG, L., EVANS, R. R., PIROZZI, G., GRAHAM, N. M., SWANSON, B., HAMILTON, J. D., RADIN, A., GANDHI, N. A., STAHL, N., YANCOPOULOS, G. D. & SUTHERLAND, E. R. 2016. Effect of Subcutaneous Dupilumab on Nasal Polyp Burden in Patients With Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 315, 469-479.
- BACHERT, C., SOUSA, A. R., LUND, V. J., SCADDING, G. K., GEVAERT, P., NASSER, S., DURHAM, S. R., CORNET, M. E., KARIYAWASAM, H. H., GILBERT, J., AUSTIN, D., MAXWELL, A. C., MARSHALL, R. P. & FOKKENS, W. J. 2017. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*, 140, 1024-1031.e14.
- BACHERT, C., ZHANG, N., HOLTAPPELS, G., DE LOBEL, L., VAN CAUWENBERGE, P., LIU, S., LIN, P., BOUSQUET, J. & VAN STEEN, K. 2010. Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 126, 962-968
- BANUELOS, J. & LU, N. Z. 2016. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T cell cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 31, 27-35.

- BEQUIGNON, E., MANGIN, D., BECAUD, J., PASQUIER, J., ANGELY, C., BOTTIER, M., ESCUDIER, E., ISABEY, D., FILOCHE, M., LOUIS, B., PAPON, J. F. & COSTE, A. 2020. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction. *J Transl Med*, 18, 136.
- BERNSTEIN, J. M., ALLEN, C., RICH, G., DRYJA, D., BINA, P., REISER, R., BALLOW, M. & WILDING, G. E. 2011. Further observations on the role of *Staphylococcus aureus* exotoxins and IgE in the pathogenesis of nasal polyposis. *Laryngoscope*, 121, 647-55.
- BEULE, A. G. 2015. Epidemiologie der chronischen Rhinosinusitis, ausgewählter Risikofaktoren und Komorbiditäten, und ihre ökonomischen Folgen. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 94, 1-23.
- BHATTACHARYYA, N. 2011. Incremental health care utilization and expenditures for chronic rhinosinusitis in the United States. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 120, 423-427.
- BIOLEGEND. 2020. *Principle of the Assay* [Online]. Available: <https://www.biolegend.com/en-us/legendplex> [Accessed 14.4.2020].
- BISWAS, S., VAN DIJCK, P. & DATTA, A. 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 349-351.
- BRAKHAGE, A. A. & LANGFELDER, K. 2002. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annual Review of Microbiology*, 56, 433-55.
- BRAUN, H., BUZINA, W., FREUDENSCHUSS, K., BEHAM, A. & STAMMBERGER, H. 2003. 'Eosinophilic fungal rhinosinusitis': a common disorder in Europe? *Laryngoscope*, 113, 264-269.
- BRUCKLACHER-WALDERT, V., STEINBACH, K., LIOZNOV, M., KOLSTER, M., HOLSCHER, C. & TOLOSA, E. 2009. Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression. *J Immunol*, 183, 5494-5501.
- BUSSE, P. J. & MATHUR, S. K. 2010. Age-related changes in immune function: effect on airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 126, 690-9; quiz 700-1.
- CHEN, S. & SCHOEN, J. 2019. Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reprod Domest Anim*, 54 Suppl 3, 38-45.
- CLELAND, E. J., BASSIOUNI, A., BOASE, S., DOWD, S., VREUGDE, S. & WORMALD, P. J. 2014. The fungal microbiome in chronic rhinosinusitis: richness, diversity, postoperative changes and patient outcomes. *Int Forum Allergy Rhinol*, 4, 259-265.
- CLELAND, E. J., BASSIOUNI, A., VREUGDE, S. & WORMALD, P. J. 2016. The bacterial microbiome in chronic rhinosinusitis: Richness, diversity, postoperative changes, and patient outcomes. *Am J Rhinol Allergy*, 30, 37-43.
- DAGENAIS, T. R. & KELLER, N. P. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 447-65.

- DERYCKE, L., EYERICH, S., VAN CROMBRUGGEN, K., PÉREZ-NOVO, C., HOLTAPPELS, G., DERUYCK, N., GEVAERT, P. & BACHERT, C. 2014. Mixed T helper cell signatures in chronic rhinosinusitis with and without polyps. *PLoS One*, 9.
- EBBENS, F. A. & FOKKENS, W. J. 2008. The mold conundrum in chronic rhinosinusitis: where do we stand today? *Current allergy and asthma reports*. Current allergy and asthma reports.
- EBBENS, F. A., SCADDING, G. K., BADIA, L., HELLINGS, P. W., JORISSEN, M., MULLOL, J., CARDESIN, A., BACHERT, C., VAN ZELE, T. P., DIJKGRAAF, M. G., LUND, V. & FOKKENS, W. J. 2006. Amphotericin B nasal lavages: not a solution for patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 1149-56.
- ERBEK, S. S., ERBEK, S., TOPAL, O. & CAKMAK, O. 2007. The role of allergy in the severity of nasal polyposis. *Am J Rhinol*, 21, 686-690.
- FEUCHTENBERGER, M., KNEITZ, C. & TONY, H. P. 2007. Zytokine. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 66, 297.
- FOKKENS, W. J., LUND, V. J., HOPKINS, C., HELLINGS, P. W., KERN, R., REITSMA, S., TOPPILA-SALMI, S., BERNAL-SPREKELSEN, M., MULLOL, J., ALOBID, I., TEREZINHA ANSELMO-LIMA, W., BACHERT, C., BAROODY, F., VON BUCHWALD, C., CERVIN, A., COHEN, N., CONSTANTINIDIS, J., DE GABORY, L., DESROSIERS, M., DIAMANT, Z., DOUGLAS, R. G., GEVAERT, P. H., HAFNER, A., HARVEY, R. J., JOOS, G. F., KALOGJERA, L., KNILL, A., KOCKS, J. H., LANDIS, B. N., LIMPENS, J., LEBEER, S., LOURENCO, O., MECO, C., MATRICARDI, P. M., O'MAHONY, L., PHILPOTT, C. M., RYAN, D., SCHLOSSER, R., SENIOR, B., SMITH, T. L., TEELING, T., TOMAZIC, P. V., WANG, D. Y., WANG, D., ZHANG, L., AGIUS, A. M., AHLSTROM-EMANUELSSON, C., ALABRI, R., ALBU, S., ALHABASH, S., ALEKSIC, A., ALOULAH, M., ALQUDAH, M., ALSALEH, S., BABAN, M. A., BAUDOIN, T., BALVERS, T., BATTAGLIA, P., BEDOYA, J. D., BEULE, A., BOFARES, K. M., BRAVERMAN, I., BROZEK-MADRY, E., RICHARD, B., CALLEJAS, C., CARRIE, S., CAULLEY, L., CHUSSI, D., DE CORSO, E., COSTE, A., EL HADI, U., ELFAROUK, A., ELOY, P. H., FARROKHI, S., FELISATI, G., FERRARI, M. D., FISHCHUK, R., GRAYSON, W., GONCALVES, P. M., GRDINIC, B., GRGIC, V., HAMIZAN, A. W., HEINICHEN, J. V., HUSAIN, S., PING, T. I., IVASKA, J., JAKIMOVSKA, F., JOVANCEVIC, L., KAKANDE, E., KAMEL, R., KARPISCHENKO, S., KARIYAWASAM, H. H., KAWAUCHI, H., KJELDSSEN, A., KLIMEK, L., KRZESKI, A., KOPACHEVA BARSOVA, G., KIM, S. W., LAL, D., LETORT, J. J., et al. 2020. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*, 58, 1-10, .
- FOKKENS, W. J., LUND, V. J., MULLOL, J., BACHERT, C., ALOBID, I., BAROODY, F., COHEN, N., CERVIN, A., DOUGLAS, R., GEVAERT, P., GEORGALAS, C., GOOSSENS, H., HARVEY, R., HELLINGS, P., HOPKINS, C., JONES, N., JOOS, G., KALOGJERA, L., KERN, B., KOWALSKI, M., PRICE, D., RIECHELMANN, H., SCHLOSSER, R., SENIOR, B., THOMAS, M., TOSKALA, E., VOEGELS, R., WANG DE, Y. & WORMALD, P. J. 2012a. EPOS 2012: European position paper on

- rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*, 50, 1-12.
- FOKKENS, W. J., VAN DRUNEN, C., GEORGALAS, C. & EBBENS, F. 2012b. Role of fungi in pathogenesis of chronic rhinosinusitis: the hypothesis rejected. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 20, 19-23.
- GHOSH, S., HOSELTON, S. A. & SCHUH, J. M. 2015. Allergic Inflammation in Aspergillus fumigatus-Induced Fungal Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 15, 59.
- GILLES, S. T.-H., CLAUDIA 2012. Das Immunsystem: Serie „Das kleine 1x1 der Immunologie“ - Einleitung. *Allergo Journal*, 21, 344.
- GSTRAUNTHALER, G. & LINDL, T. 2013. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, Springer Berlin Heidelberg.
- HASTAN, D., FOKKENS, W. J., BACHERT, C., NEWSON, R. B., BISLIMOVSKA, J., BOCKELBRINK, A., BOUSQUET, P. J., BROZEK, G., BRUNO, A., DAHLEN, S. E., FORSBERG, B., GUNNBJORNSDOTTIR, M., KASPER, L., KRAMER, U., KOWALSKI, M. L., LANGE, B., LUNDBACK, B., SALAGEAN, E., TODO-BOM, A., TOMASSEN, P., TOSKALA, E., VAN DRUNEN, C. M., BOUSQUET, J., ZUBERBIER, T., JARVIS, D. & BURNEY, P. 2011. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA(2)LEN study. *Allergy*, 66, 1216-23.
- HIZAWA, N., KAWAGUCHI, M., HUANG, S. K. & NISHIMURA, M. 2006. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy*, 36, 1109-1114.
- HOGGARD, M., WAGNER MACKENZIE, B., JAIN, R., TAYLOR, M. W., BISWAS, K. & DOUGLAS, R. G. 2017. Chronic Rhinosinusitis and the Evolving Understanding of Microbial Ecology in Chronic Inflammatory Mucosal Disease. *Clin Microbiol Rev*, 30, 321-348.
- HOHL, T. M. & FELDMESSER, M. 2007. Aspergillus fumigatus: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell*, 6, 1953-63.
- HULSE, K. E., STEVENS, W. W., TAN, B. K. & SCHLEIMER, R. P. 2015. Pathogenesis of nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*, 45, 328-46.
- ICKRATH, P., KLEINSASSER, N., DING, X., GINZKEY, C., BEYERSDORF, N., HAGEN, R., KERKAU, T. & HACKENBERG, S. 2017. Characterization of T-cell subpopulations in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy Rhinol (Providence)*, 8, 139-147.
- ICKRATH, P., SCHERZAD, A., KLEINSASSER, N., GINZKEY, C., HAGEN, R. & HACKENBERG, S. 2019. Influence of nasal polyp tissue on the differentiation and activation of T lymphocytes in a co-culture system. *Biomed Rep*, 10, 119-126.
- JIANG, R. S., SU, M. C. & LIN, J. F. 2005. Nasal mycology of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*, 19, 131-3.
- JOSS, T. V., BURKE, C. M., HUDSON, B. J., DARLING, A. E., FORER, M., ALBER, D. G., CHARLES, I. G. & STOW, N. W. 2015. Bacterial Communities Vary between Sinuses in Chronic Rhinosinusitis Patients. *Front Microbiol*, 6, 1532.
- KARATZANIS, A., CHATZIDAKIS, A., MILIONI, A., VLAMINCK, S., KAWAUCHI, H., VELEGRAKIS, S. & PROKOPAKIS, E. 2017. Contemporary Use of Corticosteroids in Rhinology. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17.

- KAUFMANN, S. H. E. 2009. T-Zellen. *In*: HAHN, H., KAUFMANN, S. H. E., SCHULZ, T. F. & SUERBAUM, S. (eds.) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- KAUFMANN, S. H. E. 2016. Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen. *In*: SUERBAUM, S., BURCHARD, G.-D., KAUFMANN, S. H. E. & SCHULZ, T. F. (eds.) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- KENNEDY, D. W., KUHN, F. A., HAMILOS, D. L., ZINREICH, S. J., BUTLER, D., WARSI, G., PFISTER, P. J. & TAVAKKOL, A. 2005. Treatment of chronic rhinosinusitis with high-dose oral terbinafine: a double blind, placebo-controlled study. *Laryngoscope*, 115, 1793-9.
- KIM, H. K., THAMMAVONGSA, V., SCHNEEWIND, O. & MISSIAKAS, D. 2012. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*, 15, 92-9.
- KLIMEK, L., CASPER, I., SIEMER, S., WOLLENBERG, B., STAUBER, R. & KOENNECKE, M. 2019. T-Zell-Immunreaktionen bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der nasalen Schleimhäute. *HNO*, 67, 883-888.
- KÖNNECKE, M., KLIMEK, L., MULLOL, J., GEVAERT, P. & WOLLENBERG, B. 2018. Subtypisierung der Polyposis nasi: Phänotypen, Endotypen und Komorbiditäten. *Allergo Journal*, 27, 34-45.
- KREHER, C. R., DITTRICH, M. T., GUERKOV, R., BOEHM, B. O. & TARYLEHMANN, M. 2003. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods*, 278, 79-93.
- LACKNER, A., STAMMBERGER, H., BUZINA, W., FREUDENSCHUSS, K., PANZITT, T., SCHOSTERITSCH, S. & BRAUN, H. 2005. Fungi: a normal content of human nasal mucus. *Am J Rhinol*, 19, 125-129.
- LAURENCE, A., TATO, C. M., DAVIDSON, T. S., KANNO, Y., CHEN, Z., YAO, Z., BLANK, R. B., MEYLAN, F., SIEGEL, R., HENNIGHAUSEN, L., SHEVACH, E. M. & O'SHEA, J. J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26, 371-381.
- LAVIGNE, P. & LEE, S. E. 2018. Immunomodulators in chronic rhinosinusitis. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 4, 186-192.
- LEDDEROSE, G. & LEUNIG, A. 2012. Von der harmlosen Besiedelung bis zur tödlichen Infektion: Pilzkrankungen der Nase und Nasennebenhöhlen. *HNO Nachrichten*, 42, 20-23.
- MARCUS, S., ROLAND, L. T., DELGAUDIO, J. M. & WISE, S. K. 2019. The relationship between allergy and chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 4, 13-17.
- MCCORMICK, A., LOEFFLER, J. & EBEL, F. 2010. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol*, 12, 1535-1543.
- MILJKOVIC, D., PSALTIS, A. J., WORMALD, P. J. & VREUGDE, S. 2017. Chronic Rhinosinusitis with Polyps Is Characterized by Increased Mucosal and Blood Th17 Effector Cytokine Producing Cells. *Front Physiol*, 8, 898.

- MILTENYI BIOTEC. MACS® Cell Separation [Online]. Available: <https://www.miltenyibiotec.com/Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf> [Accessed 26.07.2020].
- MURR, A. H., GOLDBERG, A. N. & VESPER, S. 2006. Fungal speciation using quantitative polymerase chain reaction (QPCR) in patients with and without chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 116, 1342-8.
- OAKLEY, G. M. & HARVEY, R. J. 2016. Topical Steroids. *Adv Otorhinolaryngol*, 79, 121-130.
- OFFERMANN, S. 2012. Zytokine. *Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- OLCOTT, C. M., HAN, J. K., CUNNINGHAM, T. D. & FRANZESE, C. B. 2016. Interleukin-9 and interleukin-17C in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*, 6, 841-847.
- PAWANKAR, R. 2014. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organization Journal*, 7.
- PELAIA, G., VATRELLA, A., BUSCETI, M. T., GALLELLI, L., CALABRESE, C., TERRACCIANO, R. & MASELLI, R. 2015. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*, 2015, 1-8.
- PERUSINA LANFRANCA, M., LIN, Y., FANG, J., ZOU, W. & FRANKEL, T. 2016. Biological and pathological activities of interleukin-22. *Journal of Molecular Medicine*, 94, 523-534.
- PONIKAU, J. U., SHERRIS, D. A., KEPHART, G. M., ADOLPHSON, C. & KITA, H. 2005. The role of ubiquitous airborne fungi in chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 5, 472-6.
- PONIKAU, J. U., SHERRIS, D. A., KERN, E. B., HOMBURGER, H. A., FRIGAS, E., GAFFEY, T. A. & ROBERTS, G. D. 1999. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc*, 74, 877-84.
- RAULF-HEIMSOTH, M. & STOCK, P. 2008. T-Helferzellen und ihre Zytokine. *Allergo Journal*, 17, 152-155.
- REEM, G. H. & YEH, N. H. 1984. Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science*, 225, 429-430.
- RINK, L., KRUSE, A. & HAASE, H. 2012. *Immunologie für Einsteiger*, Heidelberg, Spektrum akademischer Verlag.
- RODRIGUEZ-JIMENEZ, J. C., MORENO-PAZ, F. J., TERAN, L. M. & GUANI-GUERRA, E. 2018. Aspirin exacerbated respiratory disease: Current topics and trends. *Respir Med*, 135, 62-75.
- ROM, D., BASSIOUNI, A., EYKMAN, E., LIU, Z., PARAMASIVAN, S., ALVARADO, R., EARLS, P., PSALTIS, A. J. & HARVEY, R. J. 2019. The Association Between Disease Severity and Microbiome in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 129, 1265-1273.
- ROMANI, L. 2000. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J Leukoc Biol*, 68, 175-9.
- ROSS, S. H. & CANTRELL, D. A. 2018. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 36, 411-433.

- SCHLEIMER, R. P. 2017. Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Annu Rev Pathol*, 12, 331-357.
- SCHÜTT, C. & BRÖKER, B. 2011. Wie erkennen die Immunzellen ein Antigen? *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- SETTIPANE, R. A., BORISH, L. & PETERS, A. T. 2013. Chapter 16: Determining the role of allergy in sinonasal disease. *Am J Rhinol Allergy*, 27 S56-58.
- SHIN, S. H., PONIKAU, J. U., SHERRIS, D. A., CONGDON, D., FRIGAS, E., HOMBURGER, H. A., SWANSON, M. C., GLEICH, G. J. & KITA, H. 2004. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 1369-1375.
- STUCK, B. A., BACHERT, C., FEDERSPIL, P., HOSEMANN, W., KLIMEK, L., MOSGES, R., PFAAR, O., RUDACK, C., SITTER, H., WAGENMANN, M. & HORMANN, K. 2007. Leitlinie "Rhinosinusitis" der deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. *HNO* 55, 762-763.
- STUCK, B. A., BEULE, A., JOBST, D., KLIMEK, L., LAUDIEN, M., LELL, M., VOGL, T. J. & POPERT, U. 2018. Leitlinie „Rhinosinusitis“ – Langfassung. *HNO*, 66, 41, 38-42, 50-58, 38-39, 51-61, 42,.
- SUDOWE, S. 2013. Zytokine regulieren Qualität der Immunantwort. *Allergo Journal*, 22, 166-167.
- TOMASSEN, P., VANDEPLAS, G., VAN ZELE, T., CARDELL, L. O., AREBRO, J., OLZE, H., FORSTER-RUHRMANN, U., KOWALSKI, M. L., OLSZEWSKA-ZIABER, A., HOLTAPPELS, G., DE RUYCK, N., WANG, X., VAN DRUNEN, C., MULLOL, J., HELLINGS, P., HOX, V., TOSKALA, E., SCADDING, G., LUND, V., ZHANG, L., FOKKENS, W. & BACHERT, C. 2016. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*, 137, 1449-1456.e4.
- TURNER, J. H., CHANDRA, R. K., LI, P., BONNET, K. & SCHLUNDT, D. G. 2018. Identification of clinically relevant chronic rhinosinusitis endotypes using cluster analysis of mucus cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1895-1897.e7.
- VAN DER VEEN, J., SEYS, S. F., TIMMERMANS, M., LEVIE, P., JORISSEN, M., FOKKENS, W. J. & HELLINGS, P. W. 2017. Real-life study showing uncontrolled rhinosinusitis after sinus surgery in a tertiary referral centre. *Allergy*, 72, 282-290.
- VAN ZELE, T., GEVAERT, P., WATELET, J. B., CLAEYS, G., HOLTAPPELS, G., CLAEYS, C., VAN CAUWENBERGE, P. & BACHERT, C. 2004. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 981-983.
- VICKERY, T. W. & RAMAKRISHNAN, V. R. 2017. Bacterial Pathogens and the Microbiome. *Otolaryngol Clin North Am*, 50, 29-47.
- VICKERY, T. W., RAMAKRISHNAN, V. R. & SUH, J. D. 2019. The Role of Staphylococcus aureus in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 19, 21.
- WANG, S. Y., HSU, M. L., TZENG, C. H., HSU, H. C. & HO, C. K. 1998. The influence of cryopreservation on cytokine production by human T lymphocytes. *Cryobiology*, 37, 22-9.

- WANG, X., ZHANG, N., BO, M., HOLTAPPELS, G., ZHENG, M., LOU, H., WANG, H., ZHANG, L. & BACHERT, C. 2016. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1344-1353.
- WEBER, R. K. 2015. Aktueller Stand der endonasalen Nasennebenhöhlenchirurgie. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 94, 65-70.
- WESCHTA, M., RIMEK, D., FORMANEK, M., POLZEHL, D., PODBIELSKI, A. & RIECHELMANN, H. 2004. Topical antifungal treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a randomized, double-blind clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 1122-8.
- WISE, S. K., LAURY, A. M., KATZ, E. H., DEN BESTE, K. A., PARKOS, C. A. & NUSRAT, A. 2014. Interleukin-4 and interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction protein expression. *Int Forum Allergy Rhinol*, 4, 361-70.
- YEN, C.-J., LIN, S.-L., HUANG, K.-T. & LIN, R.-H. 2000. Age-associated changes in interferon- γ and interleukin-4 secretion by purified human CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Journal of Biomedical Science*, 7, 317-321.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Immunsystems mit den wichtigsten zellulären und humoralen Bestandteilen	1
Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten Zytokine der T-Zellen und deren Wirkungsort an Zellen des Immunsystems.....	3
Abbildung 3: Übersicht über die 10 Cluster, die gemessenen Zytokine, die Phänotypen und die Komorbidität mit Asthma bronchiale	11
Abbildung 4: Phasentrennung Vollblut in Leukosep Röhrchen.....	23
Abbildung 5: Gating Strategie CD4 ⁺ -T-Zellen – Negativkontrolle einer Polypenprobe	31
Abbildung 6: Vergleich der Ki-67-Aktivität der lokalen T-Zellen (Polyp) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRScNP nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i>	36
Abbildung 7: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (entz. NSH) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRSsNP nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i>	36
Abbildung 8: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (gesunde NSH (grün)) und peripheren T-Zellen (PBMC (schwarz)) von gesunden Patienten aus der Kontrollgruppe nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i>	37
Abbildung 9: Vergleich der Ki67-Aktivität ortständiger CD4 ⁺ T-Zellen.....	38
Abbildung 10: Vergleich der Ki67-Aktivität ortständiger CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
Abbildung 11: Vergleich der Aktivität peripherer T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i> : Kontrolle(grün), CRScNP (blau), CRSsNP (lila).....	40
Abbildung 12: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (Polyp) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRScNP nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i>	41
Abbildung 13: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (entz. NSH) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten mit CRSsNP nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i>	41
Abbildung 14: Vergleich der Ki67-Aktivität der lokalen T-Zellen (gesunde NSH) und peripheren T-Zellen (PBMC) von Patienten aus der Kontrollgruppe nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i>	42

Abbildung 15: Ki67-Aktivität der ortständigen CD4 ⁺ -T-Zellen im Vergleich (CRScNP,CRSsNP,Kontrolle) nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i> :.....	43
Abbildung 16: Ki67-Aktivität der peripheren-T-Zellen im Vergleich (CRScNP, CRSsNP, Kontrolle) nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i> :.....	44
Abbildung 17: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRScNP	45
Abbildung 18: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRSsNP	45
Abbildung 19: Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRScNP nach Kultur mit <i>C. albicans</i>	46
Abbildung 20:Vergleich der Ki67-Aktivität der ortständigen T-Zellen von Patienten mit CRSsNP nach Kultur mit <i>C. albicans</i>	46
Abbildung 21: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th1/Th17-Musters nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i> ;	47
Abbildung 22: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th2-Musters nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i> ;	48
Abbildung 23: Zytokinexpression IL-17a der ortständigen CD4 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>Aspergillus</i>	50
Abbildung 24: Zytokinexpression IL-17f der ortständigen CD8 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>Aspergillus</i>	51
Abbildung 25: Zytokinexpression IL-6 der ortständigen CD4 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>Aspergillus</i>	53
Abbildung 26:Zytokinexpression IL-4 der ortständigen CD4 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>Aspergillus</i>	55
Abbildung 27: Zytokinexpression IL-5 der ortständigen CD4 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>Aspergillus</i>	56
Abbildung 28: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th1/Th17-Musters nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i> ;.....	57
Abbildung 29: gemessene Konzentrationen der Zytokine des Th1/Th17-Musters nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i> ;.....	57
Abbildung 30: Zytokinexpression IL-17a der ortständigen CD8 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i>	59

Abbildung 31: Zytokinexpression IL-17f der ortständigen CD8 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Candida	60
Abbildung 32: Zytokinexpression IL-9 der ortständigen CD8 ⁺ T-Zellen nach 6-tägiger Kultur mit Candida	62
Abbildung 33: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRScNP nach Kultur mit <i>A. fumigatus</i>	63
Abbildung 34: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRSsNP nach Kultur mit <i>A. fumigatus</i>	64
Abbildung 35: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRScNP nach Kultur mit <i>C. albicans</i>	64
Abbildung 36: Zytokinexpression der Subgruppen der Patienten mit CRSsNP nach Kultur mit <i>C. albicans</i>	65

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten Zytokine und ihre wichtigsten Funktionen im Organismus.....	4
Tabelle 2: gemessene Biomarker und deren funktionelle Einteilung in Gruppen (Tomassen et al., 2016)	10
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	15
Tabelle 4: verwendete Materialien.....	16
Tabelle 5: verwendete Antikörper.....	19
Tabelle 6: Verwendete Software	20
Tabelle 7: Patienteneigenschaften	34
Tabelle 8: Bei dem Vergleich der CRScNP-, CRSsNP- und Kontrollgruppe signifikant veränderte Zytokinkonzentrationen nach 6-tägiger Kultur mit <i>A. fumigatus</i>	48
Tabelle 9:Bei dem Vergleich der CRScNP-, CRSsNP- und Kontrollgruppe signifikant veränderte Zytokinkonzentrationen nach 6-tägiger Kultur mit <i>C. albicans</i>	58

10 Anhang

Anhang 1: Legendplex Assay 1. Protokoll

Gewebekulturüberstände wurden bis zur Verwendung mit dem Assay bei ≤ 20 °Celsius lichtgeschützt aufbewahrt.

Herstellung der Standards für die Standardkurve:

- der gefriergetrocknete Standardcocktail wurde mit 250 Assay Puffer vermischt
- Vermischen und Auftauen des Standardcocktails über 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Überführung des Standards in ein Eppendorf Gefäß, dieser entspricht dem höchsten Standard (C7) mit einer Konzentration von 10 000 pg/ml
- Markierung von 6 weiteren Eppendorf Gefäßen
- Hinzufügen von 75 µl Assay Puffer zu den 6 Gefäßen
- Überführen von 25 µl von C7 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C6)
- Überführen von 25 µl von C6 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C5)
- Überführen von 25 µl von C5 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C4)
- Überführen von 25 µl von C4 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C3)
- Überführen von 25 µl von C3 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C2)
- Überführen von 25 µl von C2 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C1)
- Niedrigster Standard enthält ausschließlich Assay Puffer (C0)
- Alle Standards (C0-C7) wurden in doppelter Ausführung im Assay gemessen

Herstellen des Waschpuffers

- Waschpuffer auf Raumtemperatur erwärmen lassen
- 25 ml Waschpulver mit 475 deionisiertes Wasser vermischen und bis zur Verwendung auf 2-8 ° Celsius aufbewahren

Das Assay wurde in einer 96-Well V-Boden-Platte aus Polypropylen durchgeführt.

- alle Reagenzien wurden vor der Benutzung auf Raumtemperatur gebracht
- 15 µl Assay Puffer wurde zu jedem Well hinzugefügt
- 15 µl des Standards / des Überstandes wurden zum jeweiligen Well hinzugefügt
- gemischte Beads 1 Minute vortexen
- 15 µl gemischte Beads wurden zu jedem Well hinzugefügt
- 15 µl Detection Antikörper wurden zu jedem Well hinzugefügt
- Abdecken der Platte mit Aluminiumfolie
- auf einem Plattenshakers wurden die Platten mit 600 rpm für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt
- im Anschluss daran Hinzufügen von 15 µl SA-PE zu jedem Well
- Abdecken der Platte mit Aluminiumfolie
- Auf einem Plattenshaker wurden die Platten bei 600 rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt
- Zentrifugation der Platten bei 1000 x g für 5 Minuten
- Entfernen des Überstandes unter Belassen der Beads
- Hinzufügen von 200 µl Waschpuffer
- Auf dem Shaker bei 600 rpm 1 Minute vermischen
- Zentrifugation bei 1000 x g für 5 Minuten
- Entfernen des Überstandes
- Auflösen der Beads in 200 µl Waschpuffer und Überführen in FACS Rörhchen
- Messung im FACS Canto

Anhang 2: Legendplex Assay 2. Protokoll

Gewebekulturüberstände wurden bis zur Verwendung mit dem Assay bei ≤ 20 °Celsius lichtgeschützt aufbewahrt.

Herstellung der Standards für die Standardkurve:

- der gefriergetrocknete Standardcocktail wurde mit 250 Assay Puffer vermischt
- Vermischen und Auftauen des Standardcocktails über 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Überführung des Standards in ein Eppendorf Gefäß, dieser entspricht dem höchsten Standard (C7) Die Konzentration von C7 war lotspezifisch und wurde für jedes Kit und jedes Zytokin einzeln angegeben. In der Auswertung mit der Legendplex Data Analysis Software wurde die vom Hersteller angegebenen Konzentrationen berücksichtigt
- Markierung von 6 weiteren Eppendorf Gefäßen
- Hinzufügen von 75 µl Assay Puffer zu den 6 Gefäßen
- Überführen von 25 µl von C7 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C6)
- Überführen von 25 µl von C6 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C5)
- Überführen von 25 µl von C5 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C4)
- Überführen von 25 µl von C4 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C3)
- Überführen von 25 µl von C3 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C2)
- Überführen von 25 µl von C2 in eines der Gefäße mit 75 µl Assay Puffer (C1)
- Niedrigster Standard enthält ausschließlich Assay Puffer (C0)
- Alle Standards (C0-C7) wurden in doppelter Ausführung im Assay gemessen

Herstellen des Waschpuffers

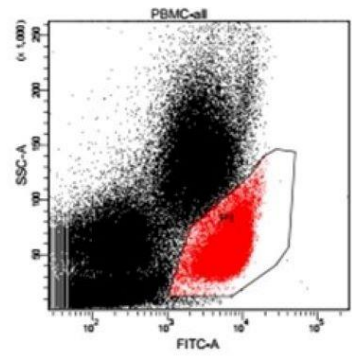
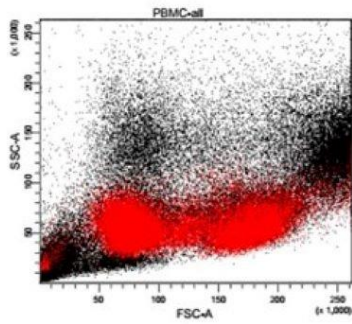
- Waschpuffer auf Raumtemperatur erwärmen lassen
- 25 ml Waschpulver mit 475 deionisiertes Wasser vermischen und bis zur Verwendung auf 2-8 ° Celsius aufbewahren

Das Assay wurde in einer 96-Well V-Boden-Platte aus Polypropylen durchgeführt.

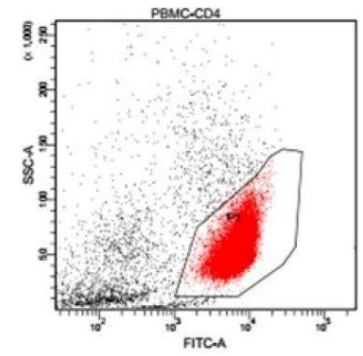
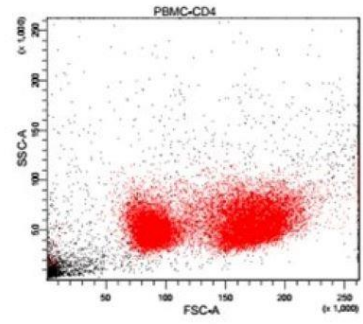
- alle Reagenzien wurden vor der Benutzung auf Raumtemperatur gebracht
- 15 µl Assay Puffer wurde zu jedem Well hinzugefügt
- 15 µl des Standards / des Überstandes wurden zum jeweiligen Well hinzugefügt
- Vortexen der gemischten Beads für 30 Sekunden
- Hinzufügen von 15 µl gemischten Beads zu jedem Well
- Abdecken der Platte mit einer Folie und Umwickeln mit einer Aluminiumfolie
- auf einem Plattenshakers wurden die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur und 600 rpm geschüttelt
- Zentrifugation der Platte bei 1050 rpm für 5 Minuten
- Entfernen des Überstandes
- Hinzufügen von 200 µl Waschpuffer
- Inkubation von 1 Minute
- Zentrifugation der Platte bei 1050 rpm für 5 Minuten
- Entfernen des Überstandes
- Hinzufügen von 15 µl Detection Antikörper zu jedem Well
- Abdecken der Platte mit einer Folie und Umwickeln mit einer Aluminiumfolie
- auf dem Shaker wurden die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur und 600 rpm geschüttelt
- Hinzufügen von 15 µl SA-PE zu jedem Well
- Abdecken der Platte mit einer Folie und Umwickeln mit einer Aluminiumfolie
- auf dem Shaker wurden die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 600 rpm geschüttelt
- Zentrifugation der Platte bei 1050 rpm für 5 Minuten
- Entfernen des Überstandes
- Hinzufügen von 200 µl Waschpuffer und Inkubation von 1 Minute
- Zentrifugation der Platte bei 1050 rpm für 5 Minuten
- Entfernen des Überstandes
- Resuspendieren der Beads in 150 µl Waschpuffer und Überführung in FACS Rörhchen
- Messung im FACS Canto

Anhang 3: Nachweis der positiven Selektion der CD4⁺ T-Zellen aus PBMC (B), mit Vergleichsprobe ohne Isolierung (A)

A

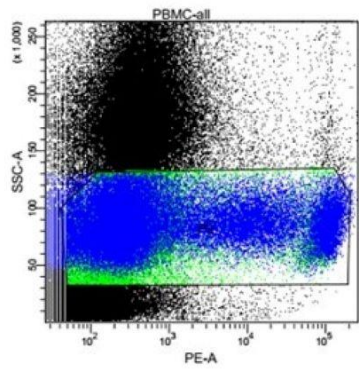
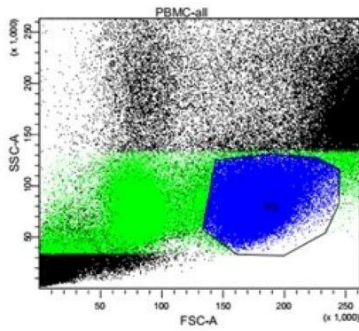


B

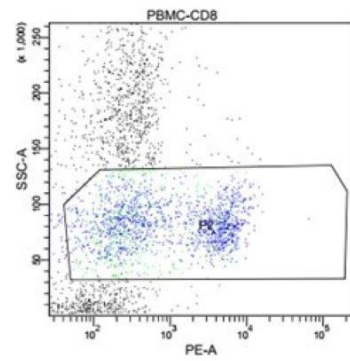
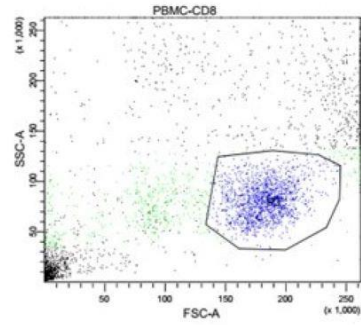


Anhang 4: Nachweis der positiven Selektion der CD8⁺ T-Zellen aus PBMC (B), mit Vergleichsprobe ohne Isolierung (A)

A



B



Anhang 5.1: Ergebnisse der Zytokinexpression der ortständigen CD4⁺ T-Zellen nach Kultur mit *A. fumigatus*

Aspergillus Gewebe	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
CD4 ⁺													
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,004	0,288	0,030	0,072	0,037	0,832	0,951	0,907	0,159	0,078	0,556	0,964	0,683
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,761	0,373	0,992	0,604	0,265	0,666	0,905	0,854	0,552	0,395	0,556	0,988	0,683
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP													
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,052	0,701	0,030	0,036	0,265	0,832	0,905	0,907	0,309	0,395	0,230	0,964	0,437
CRScNP													
MW	19,62	67,57	2,82	302,53	2340,45	31,95	1,98	68,80	19,85	2,60	30,33	681,45	21,76
CRScNP (pg/ml)													
MW	5,78	105,21	0,95	9,20	7674,69	8,14	2,44	44,24	8,25	1,46	6,91	931,83	45,96
CRScNP (pg/ml)													
MW	4,01	230,93	0,95	64,77	12030,50	53,84	1,93	97,93	3,34	0,21	17,64	940,67	35,37
Kontrolle (pg/ml)													
CRScNP SD (pg/ml)	16,66	47,27	2,03	315,69	2043,85	41,45	1,03	62,83	23,96	2,44	27,66	1127,92	23,13
CRScNP SD (pg/ml)													
CRScNP SD (pg/ml)	7,57	147,11	0,53	12,00	6189,07	13,13	2,27	68,56	10,55	2,07	8,01	1407,92	40,03
Kontrolle SD (pg/ml)	2,97	271,21	0,27	127,87	9203,46	133,75	0,96	218,57	1,11	0,15	29,77	687,65	30,63

Anhang 5.2: Ergebnisse der Zytokinexpression der ortständigen CD8⁺ T-Zellen nach Kultur mit *A. fumigatus*

Aspergillus Gewebe	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF-γ	TNF-α
CD8 ⁺													
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,133	0,935	0,348	0,582	0,514	0,313	0,930	0,759	0,025	0,403	0,694	0,949	0,710
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,133	0,935	0,923	0,825	0,514	0,964	0,631	0,759	0,229	0,403	>0,999	0,704	0,710
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,993	0,926	0,345	0,582	0,954	0,313	0,631	0,947	0,197	0,853	0,694	0,704	0,388
MW CRScNP (pg/ml)	1,38	99,72	1,36	85,59	2287,81	12,30	1,51	18,52	1,54	2,65	1,23	844,77	10,41
MW CRScNP (pg/ml)	1,39	160,55	0,90	28,80	9930,15	2,98	2,47	20,56	2,59	2,34	1,96	2460,44	48,36
MW Kontrolle (pg/ml)	2,70	124,72	0,93	39,59	170644,74	3,24	1,43	45,81	3,34	0,23	1,96	706,96	29,32
CRScNP SD (pg/ml)	0,36	127,80	0,76	115,40	2128,02	18,00	0,61	23,91	0,52	2,61	0,70	1439,13	8,90
CRScNP SD (pg/ml)	0,57	271,21	0,46	64,63	12235,43	3,58	2,90	37,97	1,54	4,64	1,78	5497,36	77,72
Kontrolle SD (pg/ml)	1,88	181,31	0,29	81,85	422987,47	0,87	0,72	86,76	1,11	0,19	1,36	661,44	24,39

Anhang 5.3: Ergebnisse der Zytokinexpression der ortständigen CD4⁺ T-Zellen nach Kultur mit *C. albicans*

Candida Gewebe	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
CD4 ⁺													
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,473	0,642	0,855	0,242	0,196	0,878	0,905	0,961	0,840	0,075	0,406	0,334	0,695
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,731	0,501	0,855	0,980	0,196	0,878	0,835	0,899	0,840	0,365	0,950	0,310	0,515
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,398	0,660	0,842	0,242	0,989	0,878	0,905	0,899	0,660	0,365	0,406	0,794	0,625
MW CRScNP (pg/ml)	9,26	9,45	1,27	38,16	3897,32	3,64	1,94	3,39	5,77	2,52	6,22	65,08	5,32
MW CRScNP (pg/ml)	1,66	3,46	0,98	3,11	5995,04	2,52	2,23	2,46	2,75	1,28	2,36	76,17	10,29
MW Kontrolle (pg/ml)	3,46	20,96	1,17	3,61	289484,35	3,97	1,68	3,31	4,27	0,24	2,53	7,33	3,08
CRScNP SD (%)	17,75	8,12	0,94	67,83	3694,97	6,59	0,82	4,42	9,36	2,69	8,36	81,76	4,41
CRScNP SD (%)	0,85	1,65	0,48	2,35	6409,40	1,98	2,18	1,30	1,86	1,87	2,31	120,14	18,96
Kontrolle SD (%)	2,16	45,80	0,85	2,41	518509,84	2,66	0,83	2,19	2,64	0,14	2,95	7,36	1,26

Anhang 5.4: Ergebnisse der Zytokinexpression der ortständigen CD8⁺ T-Zellen nach Kultur mit *C. albicans*

Candida Gewebe CD8 ⁺	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,015	0,546	0,756	0,905	0,652	0,046	0,961	0,145	0,034	0,158	0,749	0,395	0,975
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,025	0,522	0,770	0,595	0,734	0,282	0,961	0,451	0,191	0,513	0,923	0,484	0,975
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,685	0,794	0,803	0,595	0,577	0,282	0,961	0,451	0,301	0,340	0,749	0,713	0,972
MW CRScNP (pg/ml)	1,34	14,07	0,90	9,67	3999,86	1,41	1,66	1,78	1,61	2,87	1,62	71,57	3,58
MW CRScNP (pg/ml)	1,62	9,58	0,98	2,77	10171,21	2,52	1,92	2,46	2,63	1,10	2,60	55,89	3,16
MW Kontrolle (pg/ml)	3,46	31,07	1,17	10,47	8376,81	3,97	1,61	3,31	4,27	0,24	2,50	9,40	3,37
CRScNP SD (pg/ml)	0,36	16,37	0,38	12,77	4098,32	0,65	0,67	0,29	0,53	4,24	0,61	121,52	2,61
CRScNP SD (pg/ml)	0,84	17,63	0,48	2,49	14639,15	1,98	2,13	1,30	1,93	1,46	2,14	79,34	1,87
Kontrolle SD (pg/ml)	2,16	53,43	0,85	19,04	9717,61	2,66	0,91	2,19	2,64	0,14	2,97	13,22	1,79

Anhang 6.1: Ergebnisse der Zytokinexpression der peripheren CD4⁺ T-Zellen nach Kultur mit *A. fumigatus*

CD4 ⁺													
Aspergillus PBMC	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,714	0,819	0,122	0,976	0,525	0,997	0,843	0,888	0,852	0,087	0,853	0,887	0,669
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,760	0,819	0,677	0,976	0,525	0,846	0,748	0,888	0,642	0,357	0,721	0,399	0,397
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,664	0,994	0,181	0,976	0,964	0,846	0,748	0,855	0,642	0,357	0,853	0,399	0,288
MW CRScNP (pg/ml)	1,38	71,91	3,75	104,34	3154,97	77,78	1,48	169,99	3,67	2,08	55,40	1041,35	33,02
MW CRScNP (pg/ml)	13,34	71,68	1,69	96,51	9149,20	124,56	1,93	269,30	10,39	1,28	82,30	5106,49	115,64
MW Kontrolle (pg/ml)	9,84	48,07	1,19	124,06	169315,11	78,02	1,35	209,48	4,83	0,23	25,47	601,90	54,17
CRScNP SD (pg/ml)	0,36	41,61	3,13	86,46	4078,55	73,03	0,60	156,56	4,20	1,81	45,37	1500,73	35,64
CRScNP SD (pg/ml)	31,75	81,19	2,12	149,46	9228,74	149,85	1,80	342,99	19,14	1,77	181,61	9737,15	128,08
Kontrolle SD (pg/ml)	18,34	31,91	0,38	164,60	423436,80	115,11	0,69	227,71	3,88	0,17	34,79	424,07	85,18

Anhang 6.2: Ergebnisse der Zytokinexpression der peripheren CD8⁺ T-Zellen nach Kultur mit *A. fumigatus*

Aspergillus PBMC		IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
CD8 ⁺														
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,970	0,768	0,706	0,955	0,506	0,920	0,731	0,637	0,008	0,282	0,921	0,727	0,457	
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,970	0,669	0,706	0,820	0,506	0,401	0,621	0,619	0,101	0,442	0,921	0,540	0,409	
p-Wert CRScNP vs. CRS	0,970	0,625	0,505	0,820	0,957	0,401	0,697	0,798	0,186	0,603	0,921	0,620	0,172	
MW CRScNP (pg/ml)	2,81	51,82	2,40	119,12	3558,03	8,45	1,51	118,84	3,67	2,13	9,64	1466,23	16,15	
MW CRScNP (pg/ml)	2,19	123,55	1,06	64,01	10727,03	42,36	2,14	136,40	10,39	1,59	8,36	4203,34	71,98	
MW Kontrolle (pg/ml)	2,70	71,06	1,84	123,35	173050,26	10,78	1,23	60,14	4,83	0,39	5,93	380,26	37,39	
CRScNP SD (pg/ml)	3,92	27,53	2,15	130,47	4222,22	7,51	0,55	132,89	4,20	1,79	12,52	2034,31	15,23	
CRScNP SD (pg/ml)	2,31	185,97	0,44	57,44	10196,09	71,54	2,46	153,73	19,14	2,72	13,71	9713,13	76,27	
Kontrolle SD (pg/ml)	1,88	89,48	2,51	194,37	422062,05	19,09	0,79	82,76	3,88	0,55	9,32	261,27	46,23	

Anhang 6.3: Ergebnisse der Zytokinexpression der peripheren CD4⁺ T-Zellen nach Kultur mit *C. albicans*

Candida PBMC	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
CD4 ⁺													
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,753	0,860	0,949	0,857	0,511	0,754	0,817	0,846	0,954	0,137	0,591	0,228	0,818
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,753	0,823	0,949	0,722	0,797	0,754	0,799	0,694	0,954	0,433	0,653	0,545	0,818
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,605	0,823	0,961	0,857	0,533	0,845	0,817	0,846	0,954	0,433	0,749	0,424	0,983
MW CRScNP (pg/ml)	1,69	13,20	1,29	6,27	3727,93	2,97	1,83	6,61	6,40	2,93	20,48	184,59	14,10
MW CRScNP (pg/ml)	4,66	7,44	1,27	9,16	8561,60	2,69	2,24	10,16	5,06	1,42	15,66	83,53	13,88
MW Kontrolle (pg/ml)	3,46	11,90	1,06	3,61	9789,57	3,97	1,65	3,31	4,36	0,26	3,22	31,90	5,73
CRScNP SD (%)	1,17	13,91	0,88	9,83	3228,47	3,63	1,03	9,07	13,14	3,75	37,00	257,64	19,36
CRScNP SD (%)	8,66	8,15	1,05	17,27	10226,79	1,87	2,08	21,65	6,47	2,30	35,53	124,91	30,07
Kontrolle SD (%)	2,16	19,44	0,89	2,41	12308,05	2,66	0,86	2,19	2,60	0,16	3,28	48,15	6,11

Anhang 6.4: Ergebnisse der Zytokinexpression der peripheren CD8⁺ T-Zellen nach Kultur mit *C. albicans*

Candida PBMC CD8 ⁺	IL-17a	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13	IL-17f	IL-21	IL-22	INF- γ	TNF- α
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,015	0,661	0,519	0,412	0,506	0,046	0,873	0,339	0,031	0,148	0,529	0,316	0,967
p-Wert Kontrolle vs. CRScNP	0,026	0,487	0,528	0,964	0,506	0,282	0,797	0,461	0,234	0,508	0,884	0,466	0,967
p-Wert CRScNP vs. CRScNP	0,685	0,661	0,813	0,412	0,957	0,282	0,797	0,667	0,236	0,508	0,529	0,627	0,967
MW CRScNP (pg/ml)	1,34	9,52	0,90	1,93	3811,26	1,41	1,53	2,13	1,61	2,55	1,34	119,66	5,01
MW CRScNP (pg/ml)	1,62	4,46	0,98	3,67	10000,41	2,52	2,11	2,46	2,76	1,50	2,71	91,05	6,46
MW Kontrolle (pg/ml)	3,46	17,88	1,30	3,61	151674,31	3,97	1,64	3,31	4,27	0,37	2,55	25,15	5,25
CRScNP SD (pg/ml)	0,36	11,86	0,38	1,72	3774,64	0,65	0,64	0,53	0,53	3,00	0,69	135,39	4,30
CRScNP SD (pg/ml)	0,84	2,46	0,48	2,90	12515,75	1,98	2,13	1,30	1,85	2,06	2,25	144,20	9,61
Kontrolle SD (pg/ml)	2,16	32,94	0,92	2,41	395446,09	2,66	0,88	2,19	2,64	0,42	2,95	37,21	5,73

Publikation

Kongressbeitrag

ICKRATH, P. SPRÜGEL, L. BEYERSDORF, N. HAGEN, R. HACKENBERG, S.
2020.

Stimulierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Candida albicans bei Patienten mit chronischer Rhinosinusitis (CRS)

ICKRATH, P. SPRÜGEL, L. BEYERSDORF, N. HAGEN, R. HACKENBERG, S.
2019.

Stimulierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Aspergillus fumigatus bei Patienten mit chronischer Rhinosinusitis (CRS)

Manuskript

Eingereicht am 30.10.2020 (Veröffentlichung ausstehend) beim American Journal of Rhinology and Allergy

ICKRATH, P. SPRÜGEL, L. BEYERSDORF, N. SCHERZAD; A. HAGEN, R. HACKENBERG, S.
Detection of Candida albicans specific CD4⁺ und CD8⁺ T-cells in blood and nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt:

- Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen, Direktor der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, für die Möglichkeit einer Dissertation in seiner Klinik
- Prof. Dr. med. Stephan Hackenberg für das interessante Thema und die kompetente Betreuung der Arbeit
- meinem Betreuer Dr. med. Pascal Ickrath, der mich die ganze Zeit über mit Freude und einem Lächeln kompetent begleitete, in jeder noch so aussichtslos erscheinenden Situation einen kühlen Kopf bewahrte und mich insgesamt sowohl menschlich als auch fachlich großartig betreute
- Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf für seine Diskussionsbereitschaft, die freundliche Unterstützung sowie seine jederzeit geltende Offenheit für fachlichen Fragen
- Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der AG Beyersdorf, der AG Kerstan sowie dem ganzen Laborteam aus der HNO Klinik für ihre Unterstützung und Freundlichkeit in allen fachlichen Fragen. Ganz besonders gilt mein Dank Herr Michael Kessler, für seine liebenswerte Art und die ausdauernde Einarbeitung in die Labortechniken
- Allen Patienten, die mir die Möglichkeit gegeben haben mit ihrem Gewebe und Blut die Versuche dieser Arbeit durchführen zu dürfen
- Meinen Brüdern Milian und Tobi für die Unterstützung bei der Einarbeitung in mir bisher unbekannte Computerprogramme
- Meinem Verlobten Christopher für die seelische Unterstützung, seinen Beistand und die unermüdliche Rechtschreibkontrolle – danke dass du immer an mich geglaubt hast!

Ganz besonders geht mein Dank aber an meine Eltern, ohne die mein Studium und meine Promotion niemals möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lisa Melanie Sprügel
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

2011-2017 Zahnmedizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

03/2013 Erfolgreich bestandene naturwissenschaftliche Vorprüfung

03/2015 Erfolgreich bestandene zahnärztliche Vorprüfung

11/2017 Erfolgreich bestandene zahnärztliche Prüfung

12/2017 Approbation

04/2021 Promotion an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
