

**Aus der Sektion Pädiatrische Pneumologie & Allergologie
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kopp**

**Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting**

**Zytokinkonzentrationen im Serum von Kindern und
Erwachsenen mit Asthma bronchiale unterliegen
saisonalen Schwankungen am Beispiel der ALLIANCE
Kohorte**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Lena Blum
(ehemals Lena Liboschik)
aus Bad Honnef

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Kopp
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Lutz Welker

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.03.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung und Fragestellung.....	9
1.1 Asthma – Epidemiologie und Definition	9
1.2 „Asthma-Syndrom“.....	10
1.3 Von Asthmaphänotypen zur gezielten Asthmatherapie.....	16
1.4 Die ALLIANCE Studie (All Age Asthma Kohorte)	18
1.5 Phänotypisierung anhand von Zytokinen.....	19
1.6 Fragestellung.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Studienpopulation.....	21
2.2 Ablauf der Patientenrekrutierung und der Studienvsiten	23
2.3 Datenerhebung/-speicherung/-qualitätssicherung	24
2.4 Zytokinbestimmung mittels Multiplex-Bead Array	24
2.5 Statistische Methoden	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Studienpopulation.....	28
3.2 Ergebnisse der Zytokinbestimmungen.....	31
3.2.1 Gemessene Zytokinkonzentrationen der KIRA und ERA Kohorte	31
3.2.2 Transformation der Daten.....	34
3.2.3 Vergleich der KIRA und ERA Daten.....	36
3.2.4 Saisonalitätsanalysen mittels Cosinor Model	38
3.2.5 Untersuchung von Gruppenunterschieden und Saisonalität	45
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung	60
Literaturverzeichnis	61
Danksagung	67
Lebenslauf.....	68

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ALLIANCE	All Age Asthma Cohort
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ARCN	Airway Research Centre North
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	Body Mass Index
BREATH	Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPAP	Continuous positive airway pressure
CPC-M	Comprehensive Pneumology Centre Munich
CVI	Chronisch venöse Insuffizienz
DCs	Dendritische Zellen
DZL	Deutsches Zentrum für Lungenforschung
ECP	Eosinophil-Cationischem Protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERA	Erwachsenen Register Asthma
FeNO	Exhalierter Stickoxid
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FGF basic	Basic fibroblast growth factor
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GINA	Global Initiative for Asthma
GLM	Generalisierte lineare Modelle
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
ICS	Inhalative Kortikosteroide
IL	Interleukin
ILC	Angeborene lymphoide Zellen
INF- γ	Interferon-gamma
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
KIRA	Kinder Register Asthma
KU	Körperliche Untersuchung
LuFu	Lungenfunktion
MBW	Multiple breath washout
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PDGF	Platelet-derived growth factor
RANTES	Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted
SOP	Standard operating procedure
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TREG	Regulatorische T-Zellen
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

VEGF
VSD

Vascular endothial growth factor
Ventrikelseptumdefekt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Wheeze und Asthma Phänotypen.....	10
Abbildung 1.2	In Anlehnung an Jutel und Akdis, „T-cell Subset Regulation in Atopy“	13
Abbildung 1.3	In Anlehnung an Locksley, „Asthma and Allergic Inflammation“	14
Abbildung 1.4	In Anlehnung an Kim et al., „Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease,“ Nat Med, pp. 633-640, 2008.	15
Abbildung 2.1	Übersicht über die untersuchten Patientenkollektive (GINA Kriterien entsprechend der „Global Strategy for Asthma Management and Prevention“) und gesunden Kontrollen zur Rekrutierung sowie Flussdiagramm zum Ablauf der Studienvsiten.....	21
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Multiplex-Bead-Arrays.....	26
Abbildung 3.1	Diagramm über die Details zum Rekrutierungsprozess der ALLIANCE Kohorte (Stand Dezember 2016).....	29
Abbildung 3.2	Beispiel Histogramme der Rohwerte von IL-7, IL-17A und G-CSF mit linksverschobener Verteilung der Messwerte aufgrund insgesamt sehr niedriger Serumkonzentrationen.	35
Abbildung 3.3	Histogramme G-CSF: unangepasst, winsorisiert, boxcox-transformiert, kombiniert winsorisiert und boxcox-transformiert.	35
Abbildung 3.4	Boxcox-transformierte Zytokinkonzentrationen in ERA (rot) und KIRA (türkis).	36-37
Abbildung 3.5	Saisonalität von IL-4, IL-1 β und TNF- α Konzentrationen in 514 Probanden bei Baseline Visite.	39
Abbildung 3.6	Saisonalität von IL-9, IL-17A, IL-1ra und MIP-1 β Konzentrationen in 514 Probanden bei Baseline Visite.	40
Abbildung 3.7	Saisonalität von IL-1ra und IL 7 Konzentrationen bei Baseline Visite - links n=411 Asthmatiker und rechts n=103 gesunde Probanden.	42
Abbildung 3.8	Saisonalität von G-CSF und MIP 1 α Konzentrationen bei Baseline Visite - links n=411 Asthmatiker und rechts n=103 gesunde Probanden.	43
Abbildung 3.9	Saisonalität von PDGF-bb und MIP 1 β Konzentrationen bei Baseline Visite - links n=411 Asthmatiker und rechts n=103 gesunde Probanden.	44
Abbildung 3.10	Saisonalität von Interleukin 8 Konzentrationen bei Baseline Visite – oben links n=411 Asthmatiker, oben rechts n=103 gesunde Probanden, unten n=514 gesamte Subpopulation.	45
Abbildung 3.11	Gruppenunterschiede für PDGF-bb und IL-7 Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in KIRA \geq 6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten.	46
Abbildung 3.12	Gruppenunterschiede für IL-4 Serumkonzentrationen zwischen Wheezern und Gesunden in KIRA <6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität.	47

Abbildung 3.13	Gruppenunterschiede für IL-9 Serumkonzentrationen zwischen Wheezern und Gesunden in KIRA <6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität.	48
Abbildung 3.14	Gruppenunterschiede für IL-17A Serumkonzentrationen zwischen Wheezern und Gesunden in KIRA <6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität.	48
Abbildung 3.15	Gruppenunterschiede für IL-13 Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in KIRA ≥ 6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität.	49
Abbildung 3.16	Gruppenunterschiede für TNF- α Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in KIRA ≥ 6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität.	50
Abbildung 3.17	Gruppenunterschiede für IL-1ra Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in ERA basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität.	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Für die Asthmatherapie in Europa zugelassene monoklonale Antikörper (Stand 05/2019)17
Tabelle 2.1	Ein-und Ausschlusskriterien der KIRA Studie.....23
Tabelle 2.2	Enthaltene Zytokine im Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex.....25
Tabelle 3.1	Studienpopulation Charakteristika der ALLIANCE Kohorte bei Baseline Visite (Stand Dezember 2016).....30
Tabelle 3.2	Rohwerte der gemessenen Zytokine KIRA <6 Jahre (G=Gesund, W=Wheeze) in pg/ml.32
Tabelle 3.3	Rohwerte der gemessenen Zytokine KIRA ≥6 Jahre (G=Gesund, A=Asthma) in pg/ml.33
Tabelle 3.4	Rohwerte der gemessenen Zytokine ERA (G=Gesund, A=Asthma) in pg/ml.34
Tabelle 3.5	Überblick über die gemessenen, boxcox-transformierten Zytokinkonzentrationen.38
Tabelle 3.6	Überblick über Saisonalität der Zytokine mit einem unter 20%igem Anteil von Messungen über- oder unterhalb der Nachweisgrenze mittels Cosinor Model (Significant seasonality based on adjusted significance level of 0.025=TRUE) – gesamte Subpopulation, Asthmatiker/Wheezer und Gesunde.41
Tabelle 3.7	Darstellung von Gruppenunterschieden mittels U-Test in Zytokinkonzentrationen (Mediane inklusive p-Werte; boxcox-transformiert) der KIRA Wheezer vor und nach Saisonalitätsanpassung der Daten.49
Tabelle 3.8	Darstellung von Gruppenunterschieden mittels U-Test in Zytokinkonzentrationen (Mediane inklusive p-Werte; boxcox-transformiert) der KIRA Asthmatiker vor und nach Saisonalitätsanpassung der Daten.50
Tabelle 3.9	Darstellung signifikanter Gruppenunterschiede in der ERA Kohorte vor und nach Saisonalitätsanpassung der Daten. ...51
Tabelle 3.10	Zusammenfassung der Analyse der Zytokinkonzentrationen der ALLIANCE Kohorte – Saisonalität, Gruppenunterschiede vor und nach Adjustierung an Saisonalität.....52

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Asthma – Epidemiologie und Definition

Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Lungenerkrankung sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter [1]. Weltweit wird die Anzahl der an Asthma erkrankten Menschen auf 300 Millionen geschätzt [2]. Vor allem aufgrund der Ausweitung des westlichen Lebensstils und einer zunehmenden Verstädterung wird mit einem weiteren Anstieg auf 400 Millionen asthmakranke Menschen bis 2025 gerechnet [3]. In West Europa tritt Asthma mit einer Prävalenz von 5,9% und in Deutschland von 6,9 % auf [3]. Damit sind allein im westlichen Europa rund 17 Millionen Menschen betroffen. Im Rahmen der ISAAC Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) wurde für das westliche Europa die Häufigkeit für das Auftreten von Asthmasymptomen bei Kindern im Alter von 6-7 Jahren auf 9,7% und bei Kindern im Alter von 13-14 Jahren auf 15,8% ermittelt [4].

Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, welche durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion charakterisiert wird [5]. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu Symptomen der Atemwegsobstruktion wie Giemen, Atemnot, Brustenge und Husten, welche sowohl zeitlich als auch in ihrer Intensität variabel sind [2]. Diese sind provoziert durch extrinsische oder intrinsische Einflüsse wie z.B. körperliche Belastung, Allergene, Wettereinflüsse oder auch Atemwegsinfektionen [6]. Die Symptome und die Atemwegsobstruktion können sich sowohl spontan als auch in Ansprechen auf eine Medikation zurückbilden [2]. Ein akuter Asthmaanfall beginnt meist mit Husten, pfeifender Atmung und Kurzatmigkeit. Das Ausatmen fällt schwer und es kommt zur Atemnot, was für viele Betroffene und ihre Angehörigen sehr beängstigend ist [7]. Bei einem Kind mit Asthma bronchiale kommt es zudem oft zu einer Einschränkung in der Aktivität des Kindes als solche, als auch zu Fehlzeiten in der Schule oder der Eltern auf ihrer Arbeitsstelle. Asthma wird damit neben der persönlichen Belastung für Patienten und ihren Angehörigen immer mehr auch zu einer gesellschaftlichen Bürde [8], [9]. In der europäischen Union wurden beispielsweise im Jahr 2011 die direkten Kosten für Krankenhausaufenthalte oder Medikamente auf 19,5 Billionen Euro und indirekte Kosten vor allem für Fehlzeiten bei der Arbeit oder der Schule auf 14,4 Billionen Euro geschätzt [10].

Insgesamt präsentiert sich das Asthma bronchiale sehr heterogen. Asthma wird daher heute zunehmend als ein „Syndrom“ verstanden und weniger als eine einzelne Erkrankung betrachtet [11] [12].

1.2 „Asthma-Syndrom“

Beim Asthma bronchiale können Patientengruppen anhand von spezifischen Merkmalen unterschieden werden, die als sogenannte „Asthma-Phänotypen“ bezeichnet werden (siehe Abbildung 1.1).

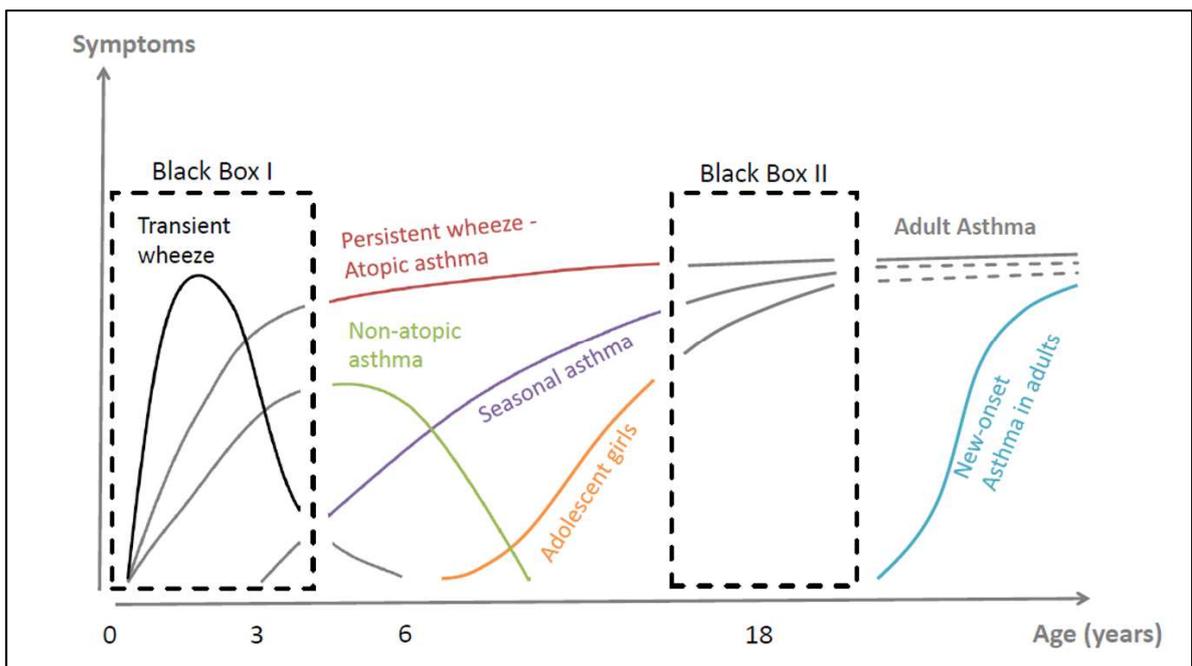


Abbildung 1.1 Wheeze und Asthma Phänotypen aus Fuchs und Bahmer et al. 2018 [13]

Bereits im ersten Lebensjahr können betroffenen Kinder unter den Symptomen der Atemwegsobstruktion (u.a. Husten, Giemen, verminderte körperliche Belastbarkeit) leiden. So kann es zu immer wiederkehrenden Bronchitiden mit einhergehender Luftnot kommen [14]. Bei den meisten Kindern bilden sich die obstruktiven Atemwegsbeschwerden nahezu vollständig zurück. So konnte in der britischen Geburtenkohorte gezeigt werden, dass im Alter von 7 Jahren 50% und ab einem Alter von 11 Jahren bereits 82% der Patienten in Remission sind. Rund 5% der Betroffenen leiden ihr Leben lang an den Symptomen und ca. 60% zeigen einen intermittierenden Verlauf [15], [16]. Diese unterschiedlichen Verläufe sind bis heute nicht vollständig verstanden. Man hofft mit einer besseren Phänotypisierung von Asthmapatienten zukünftig die Frage nach den individuellen Krankheitsverläufen

(Resolution versus Persistenz) beantworten zu können. Neben einer genaueren Prognose zum Krankheitsverlauf geht es auch darum, in den Krankheitsprozess möglicherweise präventiv eingreifen zu können, um das Fortbestehen bzw. Fortschreiten der Erkrankung bis ins Erwachsenenalter zu verhindern. Zudem zeigen immer mehr Studien, dass Therapieempfehlungen anhand klinischer Asthmaphänotypen, wie bisher in den Leitlinien angegeben, zur Krankheitskontrolle nicht ausreichend sind und die Notwendigkeit besteht, gezielter zu therapieren [17] [18] [19] [20].

Um der Heterogenität der Asthmapatienten in Bezug auf ätiologische oder pathophysiologische Merkmale gerecht zu werden, wurde über die letzten Jahre das bekannte Konzept der „Asthma-Phänotypen“ laufend weiterentwickelt. Die Beschreibung von Endotypen rücken immer mehr in den Fokus der Untersuchungen [21], [22]. Während ein Phänotyp klinische, genetische und physiologische Charakteristika einer Erkrankung ohne Bezugnahme zu pathophysiologischen Prozessen beschreibt, wird ein Endotyp gerade anhand eines bestimmten zugrundeliegenden Pathomechanismus definiert [23] [24] [25]. Einige Autoren grenzen von dem Begriff des Asthma-Endotypen den „molekularen Endotypen“ ab. Hierunter versteht man die Einteilung in Patientengruppen über die Beschreibung von einheitlichen zu Grunde liegenden Signal- und Stoffwechselwegen anhand von Reporter genen [26].

Neben dem Begriff der Phänotypen und (molekularen) Endotypen verwenden einige Autoren auch den Begriff des „Therotypen“, um damit unterschiedliche Patientenkollektive mit differentiellem Therapieansprechen zu beschreiben [27]. In wie weit sich diese nicht immer konsistent verwendeten und zum Teil nur ungenügend voneinander abgegrenzten Begriffe auch in den nächsten Jahren durchsetzen werden, bleibt abzuwarten.

Gemeinsam ist diesen Ansätzen jedoch die Herangehensweise an Asthma im Sinne einer individualisierten oder auch personalisierten Medizin. Ziel ist es, unser Verständnis des Asthma-Syndroms auf einer molekularen Ebene zu verbessern und so ein einfaches und zuverlässiges Monitoring der Entzündung und der Therapiesteuerung des Asthmas zu ermöglichen [28].

Erste phänotypische Unterscheidungen des Asthmas waren die in ein allergisches und ein nicht-allergisches Asthma bzw. extrinsisches und intrinsisches Asthma. So fand man unter anderem Unterschiede in der T-Zell-Aktivierung als auch in den

Zytokinen im peripheren Blut und in der bronchoalveolären Lavage [29]. Gerade der Phänotyp des allergischen Asthmas, bei dem die Entzündung der Atemwege und deren Obstruktion durch die Exposition mit Allergenen getriggert wird, wurde intensiv studiert. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Th2 Zellen sowie den von ihnen ausgeschütteten Zytokinen und der Entstehung des allergischen Asthmas gezeigt werden [30] [31]. Beim allergischen Asthma kommt es zu einer überschießenden Reaktion des eigenen Immunsystems auf bestimmte Umweltstoffe (Allergene). Durch die Bindung von Allergenen an spezielle Rezeptoren, „pattern recognition receptors“, auf der Zelloberfläche von Epithelzellen der Lunge kommt es zur Aktivierung dieser Zellen und zur Ausschüttung von Zytokinen [32]. Hierzu gehören unter anderem das TSLP (thymic stromal lymphopietin) und die Interleukine IL-25 und IL-33 [33]. TSLP bewirkt eine Einwanderung von Dendritischen Zellen (DCs), welche essentiell für die Induktion einer adaptiven Immunantwort sind [34]. Mit Hilfe von Dendritischen Zellen, die zu den Antigen-präsentierende-Zellen (APZ) gehören, kommt es zur Proliferation und Differenzierung naiver T Zellen in Effektor T Zellen, wie Th1, Th2, Th17 und Tregs sowie T-Gedächtniszellen. Hierfür müssen den naiven CD4 T-Zellen Antigenfragmente mittels eines Klasse-II-HLA-Moleküls auf der Zelloberfläche der APZ präsentiert werden. Welche Zelllinie der T Zellen entsteht, ist maßgeblich davon abhängig, welche Zytokine bei der T Zell Aktivierung durch die APZ ausgeschüttet werden. So bewirken zum Beispiel die Interleukine IL-4 und IL-2 vornehmlich die Entstehung von Th2 Zellen [35] [36]. Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die Differenzierung naiver T Zellen in die unterschiedlichen Effektor T-Zelllinien und ihr jeweiliges Zytokinspektrum.

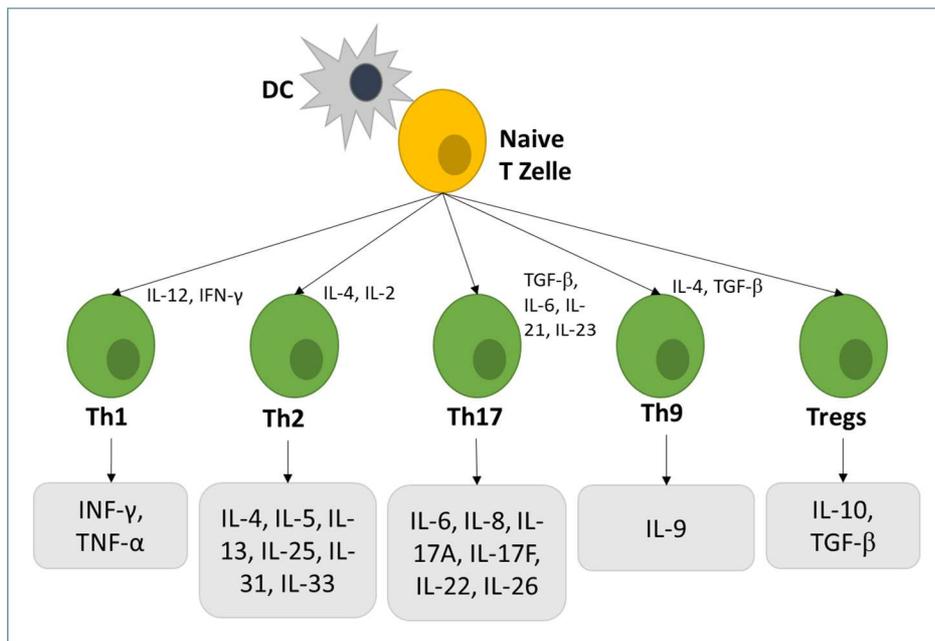


Abbildung 1.2 In Anlehnung an Jutel und Akdis, „T-cell Subset Regulation in Atopy“ *Curr Allergy Asthma Rep.*, pp. 139-145, 2011.

Beim allergischen Asthma kommt es zur Ausbildung einer Th2-Immunantwort. Th2 Zellen sezernieren u.a. Interleukin 4, 5, 13, 25, 31 und 33 und fördern damit eine chronische eosinophile Entzündungsreaktion (insbesondere durch IL-5) und induzieren den Klassenwechsel von B-Zellen hin zu IgE produzierenden B-Zellen (IL-4, IL-13) [37]. Interleukin 33 fördert die Ausschüttung von IL-4 durch Basophile, während sowohl Interleukin 33 als auch IL-25 und TSLP auf angeborene lymphoide Zellen (ILCs) wirken [38]. Durch die epitheliale Expression der Interleukine IL-25 und IL-33 sowie TSLP als Reaktion auf Viren, Allergene oder andere Noxen werden ILC2s dazu angeregt Th2 typische Zytokine wie IL-5 und IL-13 zu produzieren und führen so zu einer Entzündung der Atemwege und bronchialen Hyperreagibilität [39] [40].

Die Interleukine 4 und 13 sorgen für den Antikörperklassenwechsel, während das Interleukin 13 zusätzlich noch zur Rekrutierung von Eosinophilen und Mastzellen sowie zu einer vermehrten Mukusproduktion in den Epithelzellen der Atemwege führt [38]. Für die Regulierung von Proliferation und Differenzierung eosinophiler Granulozyten ist Interleukin 5 mitbestimmend [32] [33]. Eosinophilie ist ein charakteristisches Merkmal des Phänotyps des allergischen Asthmas, findet sich jedoch auch bei anderen Asthma Phänotypen [41]. Eosinophile Granulozyten produzieren Th1 Zytokine wie Interferon- γ und IL-2, und Th2 Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 [42]. Mastzellen sezernieren u.a. Histamin und Leukotriene und bewirken eine starke Bronchokonstriktion sowie erhöhte Kapillarpermeabilität [43]. Sie sind

somit maßgeblich an den für Asthma typischen Symptomen wie der Atemwegsobstruktion beteiligt [44]. Wenn IgE über Fc-Rezeptoren an Mastzellen und Basophilen bindet, trägt dies einerseits zur Langlebigkeit dieser Zellen bei, und führt andererseits bei einem erneuten Allergenkontakt und der Bindung des Allergens an den IgE Antikörper zur Degranulation derselben. Neben Histamin und Leukotrienen werden auch proinflammatorische Zytokine (IL-1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 16, TNF- α und TGF- β) und Chemokine (CCL1, CCL5, CCL2, CCL3 und Lymphotactin) ausgeschüttet [45].

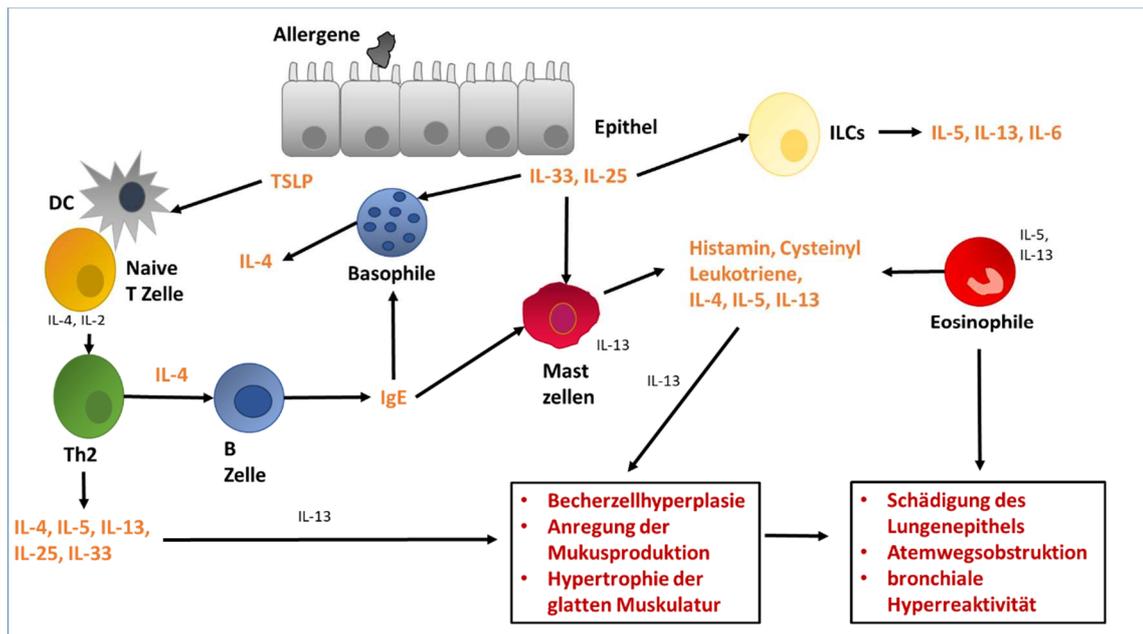


Abbildung 1.3 In Anlehnung an Locksley, „Asthma and Allergic Inflammation“, Cell, pp. 777-783, 2010.

Das allergische Asthma ist also gekennzeichnet durch eine Infiltration der Schleimhäute von Th2 Zellen, Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen sowie einer erhöhten Ausschüttung von IgE durch aktivierte B-Zellen. Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über die pathophysiologischen Prozesse beim allergischen Asthma. Das allergische Asthma kann zudem in Verbindung mit anderen atopischen Erkrankungen vorkommen. So konnten Pols et al. zeigen, dass Kinder mit einem Asthma bronchiale ein relatives Risiko von 5,41 haben ebenfalls an einer Atopischen Dermatitis und/oder einer Allergischen Rhinokonjunktivits zu erkranken [46]. Das Vorliegen einer Atopie, eine übersteigerte IgE-vermittelte Immunantwort, kann mit einem Haut-Prick-Test oder der Bestimmung des spezifischen IgEs im Serum untersucht werden [23].

Die Definition des nicht allergischen Asthmas beinhaltet die Abwesenheit einer Atopie in Form eines negativen Prick-Test oder spezifischen IgE Tests. Es wird durch unspezifische Reize wie Zigarettenrauch, kalte Luft, körperliche Anstrengung oder Infektionen verursacht, wobei es ebenso zu einer Entzündungsreaktion der Atemwege kommt [23]. Bereits im Jahr 1999 wurde durch die Arbeitsgruppe um Humbert et al. aufgezeigt, dass aus immunopathologischer Sicht wesentliche Übereinstimmungen zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Asthma bestehen [47]. So lassen sich wie beim allergischen Asthma Th2 Zellen und deren Zytokine wie IL-4 und oder IL-5, Mastzellen und Eosinophilen nachweisen [48] [49]. Es können aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in Interaktion mit Alveolarmakrophagen treten und so über die Ausschüttung von IL-13 unabhängig von Th2 Zellen zu einer Hyperreagibilität der Atemwege führen (siehe Abbildung 1.4) [50] [51].

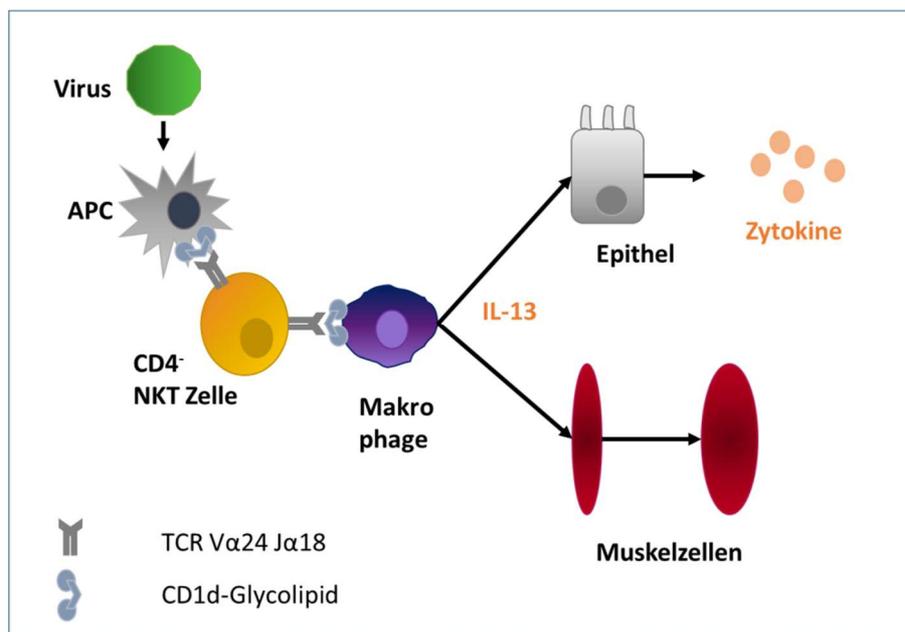


Abbildung 1.4 In Anlehnung an Kim et al., „Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease,“ Nat Med, pp. 633-640, 2008.

Natürliche Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen) bilden eine Sonderform der NK-Zellen des angeborenen Immunsystems. Charakteristisch für diese Zellen ist, dass sie auf Ihrer Zelloberfläche zusätzlich zu den für NK-Zellen typischen Rezeptoren auch T-Zellrezeptoren tragen und Antigene anders als andere T Zellen nicht anhand der typischen MHC I und II Moleküle, sondern anhand eines nicht polymorphischen Major Histocompatibility Complex der Klasse I, dem CD1d, erkennen. NK-T-Zellen

sind in der Lage eine Reihe von Zytokinen zu produzieren wie IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 und INF- γ [52].

Die Unterteilung in ein allergisches bzw. nicht-allergisches Asthma wurde mit der Zeit verlassen und von einer Einteilung in Th2-high und Th2-low assoziierte Asthmaphänotypen abgelöst [53], [21], [54]. Gerade in Hinblick auf Therapieempfehlungen stellt dieser Phänotypisierungsansatz einen entscheidenden Vorteil dar. Ein Beispiel ist die Arbeit der Arbeitsgruppe um Woodruff et al. In dieser Studie wurden Epithelzellen der Atemwege auf ihre Expression dreier Gene (POSTN-Periostin, CLCA1-Chloridkanal Regulator 1, SERPINB2-Serpin-Peptidase Inhibitor) hin untersucht, welche durch das Th2 typische Interleukin IL-13 hochreguliert werden. Anhand dieser Gene erfolgte dann die Zuordnung in eine „Th2-high“ und eine „Th2-low“ Patientengruppe. In der „Th2-high“ Patientengruppe wurden signifikant höhere Werte für Interleukin 13, Interleukin 5 mRNA und Eosinophilen sowie Mastzellen nachgewiesen. Auch zeigte dieses Patientenkollektiv einen größeren Anteil an atopischen Patienten. Am entscheidendsten aus klinischer Sicht war jedoch der Unterschied im Ansprechen auf inhalative Kortikosteroide. Während die Patienten der „Th2-high“ Gruppe ein gutes Ansprechen zeigte, taten dies die der „Th2-low“ Patientengruppe nicht [31].

1.3 Von Asthmaphänotypen zur gezielten Asthmatherapie

Die Erforschung neuer Therapieansätze sowie Ermittlung geeigneter Biomarker für eine gezielte und personalisierte Therapie des Asthma bronchiale rücken immer mehr in den Fokus der Forschung. Aktuell existieren bereits erste Medikamente zur Therapie des „Th2-high“ Asthmas. Mit Omalizumab, einem monoklonaler Antikörper gegen IgE, steht ein Therapieansatz für Asthmapatienten mit allergischen, unkontrollierten Asthma zur Verfügung. Mehrere Studien haben eine Reduktion von Asthma-Exazerbationen, eine verbesserte Asthmakontrolle und Lebensqualität sowie die Reduktion des Glukokortikoidbedarfs zeigen können [55], [56], [57]. Hanania et al. konnten zudem Faktoren identifizieren, denen ein besseres Ansprechen auf Omalizumab zuordenbar war. So scheint Omalizumab effektiver bei Patienten mit hohen Periostin Werten, hohem FeNO und hohen Eosinophilenzahlen zu sein [58].

Neuere vielversprechende gezielte Therapeutika für das Th2 assoziierte eosinophile Asthma umfassen unter anderem die anti-IL5 Antikörper Mepolizumab

und Reslizumab sowie Benralizumab, ein Antikörper gegen die IL-5-Rezeptor-alpha Kette. Während die letzten zwei genannten Antikörper bisher nur im Erwachsenenalter zugelassen sind, können Omalizumab sowie Mepolizumab bereits ab einem Alter von 6 Jahren bei schwerem allergischem Asthma eingesetzt werden. Weitere Biologika befinden sich in der Entwicklung. So steht mit Dupilumab, ein Antikörper gegen die IL-4-Rezeptoruntereinheit Alpha (IL-4R α), seit Anfang 2019 ein weiterer Wirkstoff zur Behandlung des Th2 assoziierten Asthmas für Erwachsene und Jugendliche ab 12 Jahren zur Verfügung. Dieser hemmt sowohl den IL-13 als auch den IL-4 Signalweg. Zwei aktuelle Studien zeigen bereits eine gute Wirksamkeit von Dupilumab bei Erwachsenen mit schwerem Asthma bronchiale mit Senkung des Glukokortikoidsbedarf, Verringerung der Asthmaexazerbationen sowie einer Verbesserung der Lungenfunktion (FEV1) [59], [60]. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die bisher zugelassenen Biologika in der Asthmatherapie.

Tabelle 1.1 Für die Asthmatherapie in Europa zugelassene monoklonale Antikörper (Stand 05/2019)

Antikörper (Handelsname)	Target	Zulassung	Applikation	Indikation
Omalizumab (Xolair®)	IgE	2005, Erwachsene; 2009, Kinder ≥ 6 Jahre; allergisches Asthma	alle 2-4 Wochen s.c.	Erwachsene und Kinder ≥ 6 Jahre; persistierende Symptome und rez. Exazerbationen trotz ICS/LABA HD; FEV1 < 80%, Sensibilisierung gegen ein ganzjähriges Aeroallergen; Ges.IgE zw. 30-1500 kU/l i.S.
Mepolizumab (Nucala®)	IL-5	2015 Erwachsene; 2018 Kinder ≥ 6 Jahre; eosinophiles Asthma	alle 4 Wochen s.c.	Erwachsene und Kinder/Jugendliche ab 6 Jahren; schweres, therapierefraktäres, eosinophiles Asthma
Reslizumab (Cinqaero®)	IL-5	08/2016, eosinophiles Asthma	alle 4 Wochen i.v.	als Zusatztherapie bei erwachsenen Patienten mit schwerem eosinophilem Asthma, das trotz hochdosierter inhalativer Kortikosteroide plus einem anderen Arzneimittel zur Erhaltungstherapie nur unzureichend zu kontrollieren ist
Benralizumab (Fasenra®)	IL-5-Rezeptor	01/2018, eosinophiles Asthma	alle 8 Wochen s.c.	Add-on-Erhaltungstherapie bei erwachsenen Patienten mit schwerem eosinophilem Asthma, das trotz hochdosierter inhalativer Kortikosteroide plus lang wirksamer Beta-Agonisten unzureichend kontrolliert ist
Dupilumab (Dupixent®)	IL-4R α	03/2019, Typ-2 Inflammation	alle 2 Wochen s.c.	Add-on Erhaltungstherapie bei Erwachsenen und Jugendlichen ab 12 Jahren für schweres Asthma mit Typ-2-Inflammation

Auffällig ist, dass bisher ausschließlich Therapeutika des Th2-high Asthmas zur Verfügung stehen. Somit besteht aktuell eine große therapeutische Lücke für Patienten mit schwerem nicht-allergischen bzw. Th2-low Asthma. Die Suche nach geeigneten konstanten Biomarkern zur Identifizierung neuer therapeutischer Ansätze eben solcher Patientenkollektive ist damit zu Recht ein wichtiger Bestandteil aktueller Forschungsansätze.

1.4 Die ALLIANCE Studie (All Age Asthma Kohorte)

Die ALLIANCE Studie (All Age Asthma Cohort) rekrutiert an initial vier Standorten Kinder und Erwachsene mit rezidivierenden obstruktiven Bronchitiden und bekanntem Asthma bronchiale sowie gesunde Kontrollen. Bis zum Abschluss der ersten Periode im Dezember 2016 waren dies n=209 Wheezer (6 Monate bis < 6 Jahre: Wheeze mit ≥ 2 Episoden innerhalb von 12 Monaten), n=206 Asthmatiker im Alter von 6-18 Jahren und n=208 erwachsene Asthmatiker (ärztlich diagnostiziertes Asthma bronchiale entsprechend den aktuellen GINA-Kriterien [2]) sowie n=172 gesunde Kontrollen.

Ziel der ALLIANCE Kohorte ist es, verschiedene Phänotypen des Asthma bronchiale zu identifizieren und den Krankheitsverlauf vom Kleinkindalter bis in die Seneszenz besser zu verstehen. Von den rekrutierten Patienten werden detaillierte klinische Informationen erhoben und zusammen mit den Daten zur Person standardisiert erfasst. Ziel ist die Etablierung einer klinischen Kohorte mit detaillierten Patienteninformationen für eine jederzeit zugängliche Datenbank für alle kommenden klinischen Studien. Mittels standardisierter klinischer Instrumente soll eine verständliche Charakterisierung der eingeschlossenen Patienten über die Zeit erfolgen. Hierzu gehört unter anderem die Probenentnahme und -sammlung von biologischen Material. Die gesammelten Daten dienen dann der Integration von klinischen und „omics“-Daten mittels Systembiologie zur tiefen Phänotypisierung, anhand dessen dann eine Evaluierung möglicher Biomarker vorgenommen werden kann. Ein Test der gefundenen Biomarker als klinische Prädiktoren der unterschiedlichen Phänotypen soll dann in einer separaten Kohorte erfolgen. Die zu testende Hypothese des DZL Projektes ist demnach, dass verschiedene Phänotypen bzw. Untergruppen des Asthmas anhand eines Algorithmus von klinischen Merkmalen, der Genetik und Biomarkern von zu Grunde liegenden

pathophysiologischen Prozessen identifiziert werden können und somit ein individualisierter patientenbezogener Therapieansatz möglich ist.

1.5 Phänotypisierung anhand von Zytokinen

Ein möglicher Ansatzpunkt zur Unterscheidung von Untergruppen stellt die Quantifizierung von Zytokinen dar. Diese spielen in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale eine wesentliche Rolle und stellen wie oben beschrieben Ansatzpunkte für gezielte und personalisierte Therapien dar. Zytokine sind extrazelluläre Botenstoffe, die vor allem auto- und parakrin wirken und in erster Linie Wachstumsvorgänge sowie die Proliferation und Differenzierung von Zellen regulieren [61].

In der Literatur finden sich immer mehr Studien zu Phänotypisierungsansätzen und Clusteranalysen u.a. anhand von Zytokinen. So hat z.B. die Gruppe um Brown et al. 2017 anhand von Serumzytokinkonzentrationen das unkontrollierte Asthma bronchiale bei innerstädtischen afroamerikanischen Kindern auf mögliche Endotypen hin untersucht und zeigen können, dass sich anhand von Zytokinkonzentrationen Untergruppen unterscheiden lassen. Die Zytokine CXCL-1, IL-5, IL-8 und IL-17A zeigten einen positiven Zusammenhang mit einem „difficult-to-control“ Asthma, während IL-4 und IL-13 der Gruppe der „easy-to-control“ Asthmatiker zuordenbar war [62]. Auch die Daten der ALLIANCE Kohorte sollen u.a. auf Gruppenunterschiede anhand von Zytokinkonzentrationen in Serumproben hin untersucht werden.

1.6 Fragestellung

Wie auch in anderen Kohortenstudien erfolgt bei der ALLIANCE Kohorte die Rekrutierung der Patienten über das ganze Jahr verteilt. Daher stellen saisonale Effekte einen möglichen Störfaktor dar, der die Ergebnisse verzerrt, also eventuell Gruppenunterschiede anhand von Zytokinkonzentrationen vortäuscht bzw. verschleiert. Bisläng gibt es allerdings keine Daten zu saisonalen Schwankungen von Serumzytokinen bei Asthmatikern und Gesunden.

Die Ausgangshypothese dieser Arbeit war daher, dass Zytokine jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Daten unserer ALLIANCE Kohorte herangezogen und auf folgende Fragestellungen hin untersucht:

1. Unterliegen die Konzentrationen von Zytokinen im Serum von Kindern und Erwachsenen mit rezidivierenden obstruktiven Bronchitiden bzw. Asthma bronchiale und von gesunden Kontrollen saisonalen Schwankungen?
2. Zeigen unterschiedliche Zytokine differentiell ausgeprägte saisonale Schwankungen?
3. Müssen bei dem Vergleich von Asthmatikern und gesunden Kontrollen mögliche saisonale Unterschiede in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden?

Ziel dieser Arbeit war es, für jedes der untersuchten Zytokine beantworten zu können, ob saisonale Effekte existieren, sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen Asthmatikern und Gesunden finden lassen und ob die gefundenen saisonalen Effekte einen Einfluss auf die Gruppenunterschiede haben.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Die All Age Asthma Cohort (ALLIANCE) Studie wird an den teilnehmenden Standorten und den assoziierten Studienzentren des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL) in Lübeck, Großhansdorf, Hannover, München, Marburg und Köln durchgeführt. Die Finanzierung der Studie erfolgt über das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Die Studie wurde der federführenden Ethikkommission in Lübeck und von den lokalen Ethikkommissionen an allen Standorten genehmigt. Sämtliche Studienteilnehmer, bei Minderjährigen vertretend die Eltern, haben sich zur Teilnahme an der Studie schriftlich bereit erklärt. Die Registrierungsnummer bei *clinicaltrials.gov* des pädiatrischen Armes, Kinder Register Asthma (KIRA), ist NCT02496468 und die des erwachsenen Armes, Erwachsenen Register Asthma (ERA), NCT02419274. Eine ausführliche Beschreibung des Studiendesigns, der Studienpopulation und der Methoden wurde kürzlich in Detail veröffentlicht [13]. Nachfolgend findet sich eine kurze Zusammenfassung.

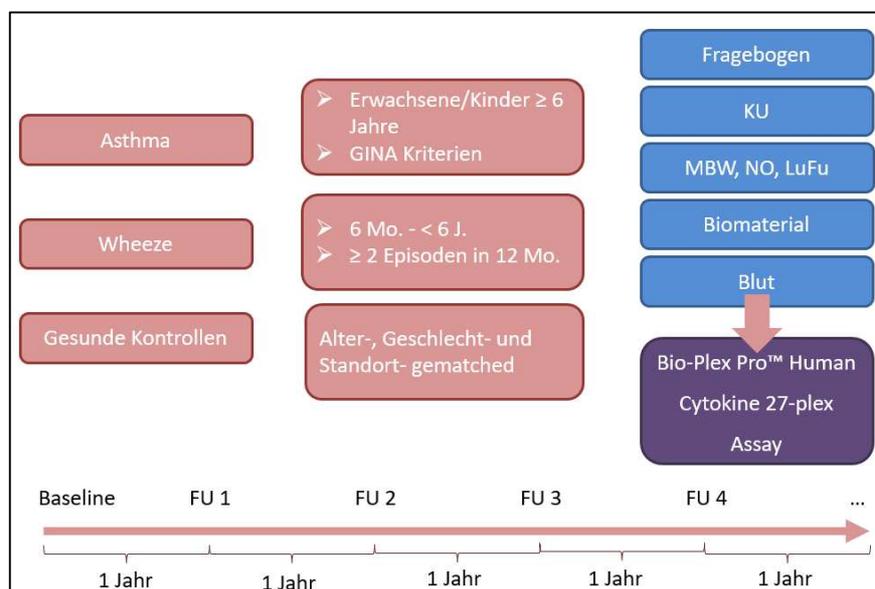


Abbildung 2.1 Übersicht über die untersuchten Patientenkollektive (GINA Kriterien entsprechend der „Global Strategy for Asthma Management and Prevention“ [2]) und gesunden Kontrollen zur Rekrutierung sowie Flussdiagramm zum Ablauf der Studienvisiten

Für die KIRA Studie wurden Säuglinge und Kleinkinder mit immer wiederkehrenden obstruktiven Bronchitiden (Einschlusskriterium 6 Monate bis < 6 Jahre: Wheeze mit ≥ 2 Episoden innerhalb von 12 Monaten) sowie Schuldkinder und Jugendliche mit

einem Asthma bronchiale (Einschlusskriterium ≥ 6 Jahre: ärztlich diagnostiziertes Asthma bronchiale entsprechend den aktuellen GINA-Kriterien [2]) berücksichtigt. Weitere Ein- und Ausschlusskriterien für Kinder finden sich in Tabelle 2.1. Bei gesunden Kontrollen darf kein Wheeze oder ein ärztlich diagnostiziertes Asthma bronchiale vorliegen, die zusätzlich in Tabelle 2.1 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien müssen ebenfalls erfüllt sein.

Im erwachsenen Studienarm wurden Patienten ≥ 18 Jahre mit Verständnis der deutschen Sprache und ärztlich diagnostiziertes Asthma bronchiale entsprechend den aktuellen GINA-Kriterien [2] rekrutiert. Weiteres Einschlusskriterium ist das vorliegende schriftliche Einverständnis der Probanden. Zur Vermeidung eines Selektionsbias wurden sowohl aktive als auch ehemalige Raucher in die Studie eingeschlossen. Bei diesen Patienten erfolgt fortlaufend ein zusätzliches Screening anhand von Merkmalen zur Unterscheidung eines Asthma bronchiales von einer COPD (Alter bei Manifestation, klinischer Verlauf, erweiterte Anamnese, variable oder persistierende Atemwegseinschränkungen, Lungenfunktionsparameter, Anzeichen für eine Lungenüberblähung). Bei nicht eindeutiger Abgrenzung zur COPD oder Auftreten von COPD typischen Merkmalen wie z.B. eine Lungenüberblähung oder einem Lungenemphysem, erfolgt der Ausschluss aus der ERA Studie. Weitere Ausschlusskriterien waren ein schwerer Infekt der oberen Luftwege oder eine pulmonale Exazerbation innerhalb der letzten 4 Wochen bei Einschluss. Gesunde erwachsene Kontrollen durften keine pulmonalen Erkrankungen haben, atopische Erkrankungen hingegen waren kein Ausschlusskriterium.

Tabelle 2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der KIRA Studie

Einschlusskriterien:

- 6 Monate bis < 6 Jahre: Wheeze mit ≥ 2 Episoden innerhalb von 12 Monaten
- ≥ 6 Jahre: ärztlich diagnostiziertes Asthma bronchiale entsprechend den aktuellen GINA-Kriterien [2]
- Reifgeborenes der ≥ 37 . Schwangerschaftswoche
- Verständnis der deutschen Sprache
- Einverständnis der Eltern
- Einverständnis des Kindes, falls das Kind älter als 8 Jahre ist

Ausschlusskriterien:

- bekannte, angeborene oder perinatale Lungenerkrankungen des Neugeborenen
- Fehlbildungen der Atemwege
- Sauerstoffbedarf nach Geburt über mehr als 24 Stunden
- maschinelle Beatmung oder Atemhilfe (CPAP) nach Geburt
- bekannte Mukoviszidose
- bekannte primäre ziliäre Dyskinesie
- andere schwere Erkrankungen des Respirationstraktes (z.B. interstitielle Lungenerkrankungen)
- angeborener Herzfehler mit Beeinflussung der pulmonalen Zirkulation (u.a. hämodynamisch relevanter VSD, Fallot-Tetralogie)
- Fieber ($> 38,5^{\circ}\text{C}$ rektal) in den letzten 2 Wochen

2.2 Ablauf der Patientenrekrutierung und der Studienvisiten

Am Anfang der Rekrutierung steht die Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien sowie eine Aufklärung der Eltern und ab 8 Jahren auch des Studienkindes bzw. des teilnehmenden Erwachsenen über die ALLIANCE Studie, bei welcher ein Informationsbogen zur Studie mit beigefügter Einverständniserklärung ausgehändigt wird. Wenn eine schriftliche Einverständniserklärung vorliegt, findet eine Baseline Visite statt und es wird einmal im Jahr zu einer Folgeuntersuchung eingeladen.

Zum ersten Besuch gehört das Ausfüllen eines Basisfragebogens, der Fragen zu den Atembeschwerden der letzten Monate und Jahre enthält, andere Beschwerden und Krankheitsbilder abfragt und Informationen zur Schwangerschaft, Geburt und Neugeborenenperiode sowie Familie, Beruf und Lebensumfeld sammelt. Zusätzlich wird ein ergänzender Fragebogen ausgefüllt, der Fragen zu den Atembeschwerden der letzten 12 Monate enthält. Dieser enthält zudem Informationen zum Impfstatus, der Asthmamedikation als auch zum aktuellen Asthmakontrollstatus.

Neben der allgemeinen ärztlichen Untersuchung durch den Studienarzt erfolgen eine Blutentnahme, die Asservierung von Biomaterialien sowie eine ausführliche Lungenfunktionsdiagnostik. Bei bisher nicht vorhandenem Schweißtest wird im pädiatrischen Arm dieser im Rahmen des ersten Besuches durchgeführt.

Für weitere Details sei auf die Veröffentlichung des Kohorten Profils verwiesen [13].

2.3 Datenerhebung/-speicherung/-qualitätssicherung

Erhoben werden Daten zum Geburtsdatum, medizinische Befunde und Behandlungsarten sowie verordnete Medikamente. Alle erhobenen Daten werden umgehend pseudonymisiert, das heißt ohne Bezug zum Namen des Studienkindes, elektronisch gespeichert und ausgewertet. Personenbezogene Daten, wie zum Beispiel die Adresse oder Telefonnummer, werden nicht elektronisch gespeichert. Der Zugriff zu den erhobenen Daten obliegt ausschließlich den Mitarbeitern der Studie, welche zur Verschwiegenheit verpflichtet sind.

Zur Qualitätssicherung der Datenerhebung bestehen verschiedene Mechanismen. Für sämtliche Abläufe und Methoden innerhalb der ALLIANCE Studie existieren entsprechende „Standard Operating Procedures“, kurz SOPs. Der Ablauf einer Studienvisite unterliegt zudem einer vorgegeben standardisierten Reihenfolge. In regelmäßigen Abständen erfolgen Kontrollen der klinischen und laboratorischen Abläufe sowie Zentrumsbesuche und Teammeetings. Die in der Datenbank erhobenen Werte werden einer Datenbereinigung unterzogen und es erfolgen stichprobenartige Kontrollen der Datensätze.

2.4 Zytokinbestimmung mittels Multiplex-Bead Array

Während der Studienvisiten erfolgt eine venöse Blutabnahme zur Gewinnung von Vollblut (S-Monovette®, Sarstedt, Deutschland), wobei u.a. ein 1,2ml Serumröhrchen zur Zytokinbestimmung abgenommen wurde. Mittels Zentrifugation (2000g, 10 min) wurde das Serum abgetrennt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

Zur Zytokinmessung kam ein Multiplex-Bead Array zum Einsatz, der die quantitative Analyse mehrerer Zytokine oder Chemokine auf einmal unter Verwendung kleinster Probenmengen (hier 25µL) erlaubt. In der ALLIANCE Studie wird der Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay (#M50-0KCAF0Y, BioRad, Muenchen, Deutschland), siehe Tabelle 2.2, zur Zytokinbestimmung verwendet, welcher mit der LUMINEX Technologie arbeitet. Die der Datenauswertung zugrunde liegende

Software ist die Bio-Plex Manager MP (Biorad, version 1.0.0.03) und das verwendete Messgerät der Bio-Plex MagPix Multiplex Reader von Bio-Rad (SerienNO:MAGPX12258701).

Tabelle 2.2 Enthaltene Zytokine im Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex

Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay #M50-0KCAF0Y			
• FGF basic	• IL-2	• IL-10	• MIP-1 α
• Eotaxin	• IL-4	• IL-12 (p70)	• MIP-1 β
• G-CSF	• IL-5	• IL-13	• PDGF-BB
• GM-CSF	• IL-6	• IL-15	• RANTES
• IFN- γ	• IL-7	• IL-17	• TNF- α
• IL-1 β	• IL-8	• IP-10	• VEGF
• IL-1ra	• IL-9	• MCP-1 (MCAF)	

Die Serumproben werden in 96er Mikrotiter Platten pipettiert, welche sogenannte Beads enthalten (Durchmesser: 6.5 μ m). Die Beads unterscheiden sich untereinander anhand einer Farbkodierung, welche mittels Mischung zweier fluoreszierender Farbstoffe erfolgt. Bis zu 100 verschiedene Farbcodes werden dadurch ermöglicht. Beads eines dezidierten Farbcodes sind mit einem Capture-Antikörper bestückt, welcher ein entsprechendes Zytokin bindet. Ähnlich dem Prinzip des Sandwich ELISAs bindet daran wiederum der Detektions-Antikörper, anhand dessen im Anschluss die quantitative Bestimmung der Zytokine erfolgt. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenzintensität des am Detektions-Antikörper gebundenen Fluorochromes pro Bead, welche direkt mit der Menge an vorhandenem Zytokin korreliert. Nach Inkubation der Proben wird der Inhalt aller Wells in das Analysegerät (Bio-Plex MagPix Multiplex Reader von Bio-Rad) gesogen. Dort werden die Beads durch die Mikrofluidik vereinzelt in Sukzession gebracht und nacheinander von zwei Lasern vermessen. Ein roter Laser (Wellenlänge, $\lambda=635$ nm) dient der Identifizierung des jeweiligen Farbcodes des Beads und der Zuordnung der gemessenen Fluoreszenzintensität zu einem Zytokin. Die Ermittlung der Fluoreszenzintensität erfolgt mittels eines grünen Lasers (Wellenlänge, $\lambda=525$ nm). Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Ablauf eines Multiplex-Bead-Arrays.

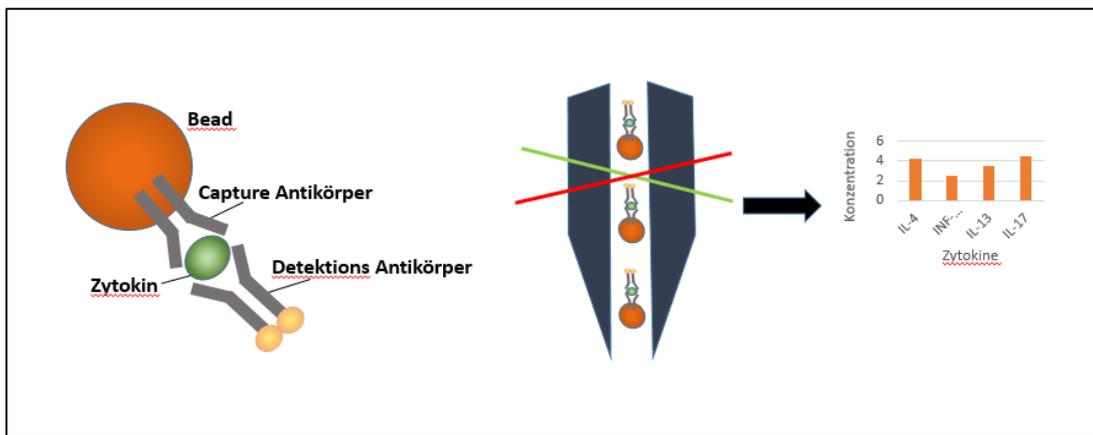


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Multiplex-Bead-Arrays

Das Multiplex Verfahren bietet im Vergleich zum traditionellen ELISA einen schnelleren und kostengünstigeren Ansatz und benötigt darüber hinaus auch insgesamt weniger Probenvolumen. Aus Kostengründen wurden Duplikate vermessen und der Mittelwert dieser für die weiteren Berechnungen herangezogen. Starke Abweichungen der Duplikate führten zum Ausschluss der Probe von den weiterführenden Analysen. Messwerte unter- oder oberhalb der Nachweisgrenze wurden auf das jeweilige Detektionslimit gesetzt.

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde mit R (Version 3.4.0) vorgenommen. Zur weiteren Analyse wurde aus den Messungen der Duplikate ein Durchschnittswert gebildet, welcher für alle weiteren Analysen herangezogen wurde. Es wurden für jedes Zytokin Minimum, Maximum, Median, 1. und 3. Quartil erfasst sowie die Anzahl der Proben bestimmt, deren Serumkonzentrationen unter bzw. über der Nachweisgrenze lag. Wenn letzteres der Fall war, wurde der Wert für die weiteren Analysen auf den Wert der Nachweisgrenze gesetzt. Lagen mehr als 20% aller gemessenen Proben außerhalb der Nachweisgrenzen wurde das Zytokin bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Um gängige Verfahren zur Analyse statistischer Daten verwenden zu können, wurde zudem eine Normalverteilung der Messdaten angestrebt. In Form von Balkendiagrammen erfolgte die Darstellung der Verteilung der Zytokinkonzentrationen für jedes einzelne Zytokin in vier unterschiedlichen Varianten: unangepasst, winsorisiert, boxcox-transformiert, kombiniert winsorisiert und boxcox-transformiert. Auf Grundlage der vorliegenden Histogramme wurde

entschieden, die boxcox-transformierten Daten zu verwenden, da hiermit insgesamt über alle Zytokine hinweg die Normalverteilung am besten realisiert werden konnte. Zur Ermittlung etwaiger saisonaler Schwankungen in den Zytokinkonzentrationen wurde das Cosinor Model auf die Daten angewendet, wobei der numerische Wert des Monats der Probenabnahme als Zeitvariable dient. Das Cosinor Model stellt eine Form der linearen Regressionsanalyse dar, welche die Methode der kleinsten Quadrate verwendet, um eine Sinuskurve an die untersuchten Beobachtungen anzupassen. Das Model spiegelt also eine lineare Darstellung eines zeitlichen Verlaufs von Daten in Form einer Sinuskurve mit Amplitude, Frequenz und Phase wieder, welches zur Ermittlung und Veranschaulichung von saisonalen Effekten dient. Die Amplitude wird definiert als der Abstand vom Durchschnittswert zum Max- bzw. Minimum und erlaubt eine Abschätzung über das Ausmaß saisonaler Unterschiede. Die Phase ist der Punkt auf der X-Achse, der dem Höchstwert entspricht, gleichbedeutend mit dem Monat mit dem höchsten Zytokinkonzentrationen. Sowohl Amplitude als auch die Phase können über die Regressionskoeffizienten des Cosinor Models geschätzt werden. [63].

Da trotz erfolgter Boxcox-Transformation weiter eine leichte linkslastige Verteilung der Zytokinkonzentrationen zu verzeichnen war, wurde zur Bestimmung möglicher Gruppenunterschiede zwischen Asthmatikern/Wheezern und Gesunden ein Mann-Whitney U-Test verwendet. Dieser gehört zur Gruppe der Lagetests und stellt eine Alternative zum t-Test für zwei unverbundene Stichproben dar. Bei diesem Verfahren werden die Werte in eine Rangfolge gebracht und anschließend die Rangsummen der beiden Gruppen miteinander verglichen. Eine Normalverteilung oder gleiche Stichprobenumfänge sind bei diesem Test keine Grundvoraussetzung. Auf eine Korrektur, z.B. mittels Bonferroni-Korrektur, bei multiplen Testen wurde bewusst verzichtet, da der Fokus der Untersuchungen auf der Ermittlung von saisonalen Effekten sowie deren Einfluss auf Gruppenunterschieden lag und nicht auf der Ermittlung von Gruppenunterschieden an sich. Gegenübergestellt wurden die Mediane inklusive p-Wert von Asthmatikern bzw. Wheezern und Gesunden vor und nach Anpassung an Saisonalität mittels des Cosinor-Models.

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

In der ALL-Age-Asthma Kohorte (ALLIANCE) wurden seit Studienbeginn im September 2013 bis zum Abschluss der ersten Periode im Dezember 2016 insgesamt 795 Patienten und gesunde Kontrollen von anfangs 813 gescreenten Erwachsenen und Kindern rekrutiert. Im pädiatrischen Arm umfasst diese Kohorte n=209 Wheezer, n=206 Asthmatiker und n=125 gesunde Kontrollen. In der erwachsenen Kohorte wurden n=208 Asthmatiker und n=47 gesunde Kontrollen rekrutiert. Davon wurden die Ergebnisse der Zytokindaten aus Serumproben von 514 Patienten sowie gesunden Probanden in dieser Arbeit ausgewertet und analysiert. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über den Rekrutierungsprozess.

Die Charakteristika der Studienpopulation der ALLIANCE Kohorte sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Dabei sind alle bis zum Zeitpunkt 31.12.2016 rekrutierten Patienten und Kontrollen dargestellt sowie die Subpopulation, in der bereits Serumzytokine analysiert wurden. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der gesamten Kohorte und der analysierten Subpopulation bezüglich Alter, Geschlechterverteilung, BMI und Anteil an aktiven Rauchern. Es zeigen sich jedoch Unterschiede im Anteil der Atopiker und Patienten ohne ein Steroid als Medikation (steroidnaive Patienten). Zwischen Erkrankten und gesunden Kontrollen zeigen sich in der untersuchten Subpopulation ebenfalls Unterschiede im Atopiestatus und der Anzahl der Probanden, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung steroidnaiv waren. Erwartungsgemäß war der Anteil männlicher Probanden bei Wheezern (n=79, 68,1%) und Asthmatikern (n=101, 67,3%) im pädiatrischen Studienarm größer als in der erwachsenen Kohorte (n=66, 45,5%). Während es unter den erwachsenen Asthmatikern 8,3% Raucher gab (gesunde Kontrollen 0%), gaben nur 2 Jugendliche an, aktiv zu rauchen. Der Anteil von Atopikern in der Gruppe der Wheezer lag bei 34,5%, bei Asthmatikern zwischen 6 und 18 Jahren bei 78,7% und bei erwachsenen Asthmatikern bei 62,8%. Insgesamt waren bei den gesunden Kontrollen weniger Atopiker zu finden: 4,5% der Kinder unter 6 Jahre, 22% der Kinder zwischen 6 und 18 Jahren und 22,6% der Erwachsenen. Der Anteil Steroid-naiver Patienten war mit 44% in der Gruppe der Wheezer am höchsten. Bei Asthmatikern älter als 5 Jahre lag der Anteil bei 17,5% und im erwachsenen Studienarm bei 11,7%.

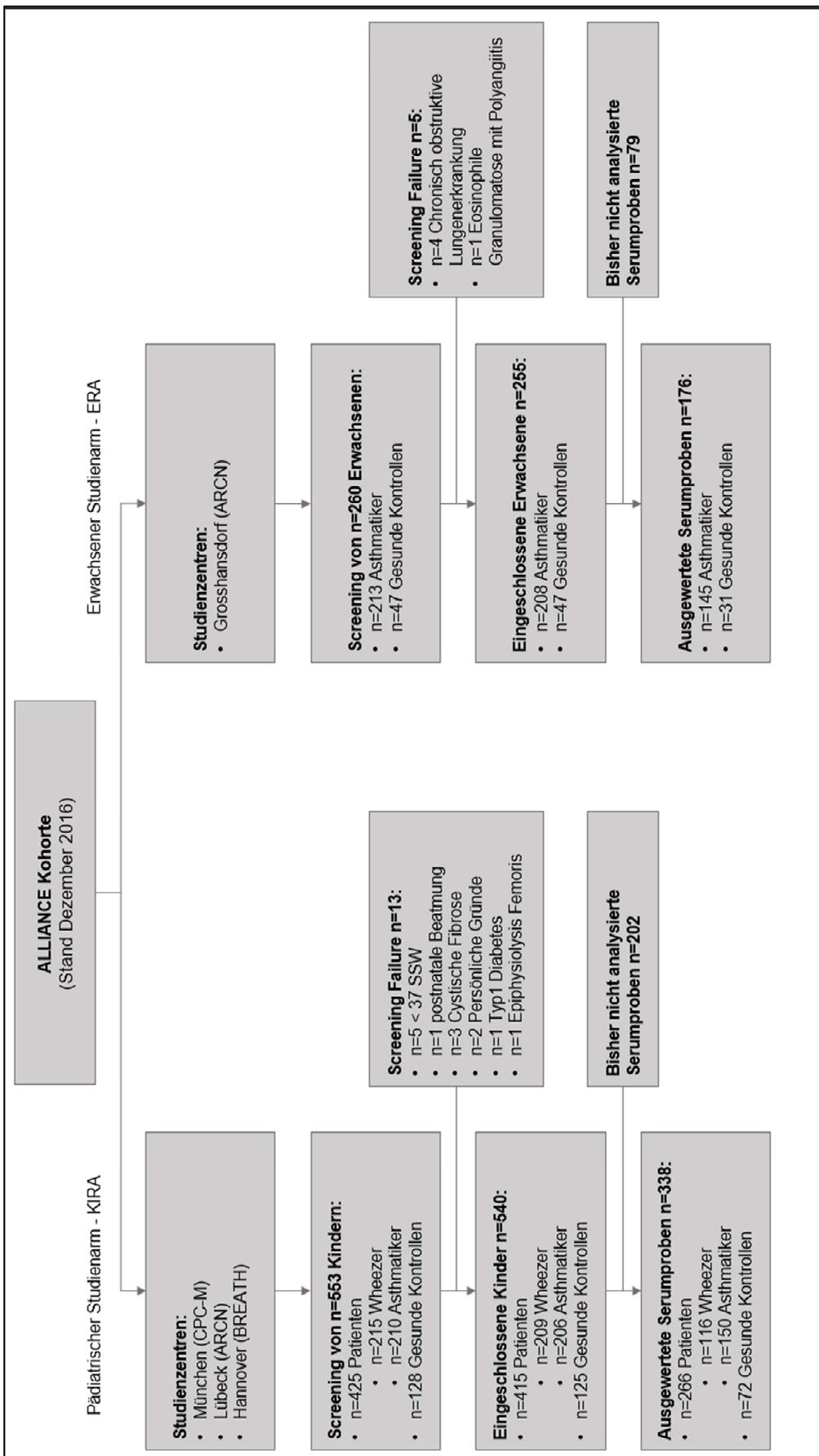


Abbildung 3.1 Diagramm über die Details zum Rekrutierungsprozess der ALLIANCE Kohorte (Stand Dezember 2016)

Tabelle 3.1 Studienpopulation Charakteristika der ALLIANCE Kohorte bei Baseline Visite (Stand Dezember 2016)

Vergleich Gesamtkohorte und untersuchte Subpopulation - Stand 31.12.2016

	Wheezer		Kontrollen < 6 Jahre		Asthmatiker (päd. Studienarm)		Kontrollen ≥		Asthmatiker (erw. Studienarm)		Kontrollen	
	Alle	Subpopulation (Zytokine)	Alle	Subpopulation (Zytokine)	Alle	Subpopulation (Zytokine)	Alle	Subpopulation (Zytokine)	Alle	Subpopulation (Zytokine)	Alle	Subpopulation (Zytokine)
Anzahl	209 (26.3%)	116 (22.6%)	41 (5.2%)	22 (4.3%)	206 (25.9%)	150 (29.2%)	84 (10.6%)	50 (9.7%)	208 (26.2%)	145 (28.2%)	47 (5.9%)	31 (6.0%)
Alter	2.96 (+-1.45)	3.12 (+-1.46)	3.12 (+- 1.78)	3.74 (+-1.56)	11.1 (+-3.16)	11.3 (+-3.15)	10.9 (+-3.04)	11.1 (+-3.09)	51.9 (+-13.7)	51 (+- 13.9)	48.5 (+-19.1)	40.3 (+-17.9)
Männlich n (%)	136 (65,1%)	79 (68,1%)	22 (53,7%)	13 (59%)	141 (68,4%)	101 (67,3%)	42 (50%)	26 (52%)	90 (43,3%)	66 (45,5%)	27 (57,4%)	20 (64,%)
BMI	16.6 (+-3.16), NA= 205	16.3 (+-1.57)	16.1 (+-1.43)	15.7 (+-1.5)	20.1 (+-5.52)	20.2 (+-5.78)	18.4 (+-3.38)	18.5 (+-3.77)	27.8 (+-5.71)	27.3 (+-5.24)	24.7 (+-3.71)	24.6 (+- 3.74)
Aktive Raucher	0	0	0	0	2 (0.1%)	2 (1.3%)	0	0	14 (6.7%)	12 (8.3%)	2 (4.3%)	0 (0%)
Atopie	59 (28.2%), NA = 22	40 (34.5%)	1 (2.4%), NA = 8	1 (4.5%)	153 (74.3%), NA = 10	118 (78.7%)	17 (20.2%), NA = 10	11 (22.0%)	91 (43.8%), NA = 63	91 (62.8%)	7 (14.9%), NA = 16	7 (22.6%)
Steroid-naiv	117 (56.0%)	51 (44.0%)	NA = 41	NA = 22	53 (25.7%)	36 (17.5%)	6 (7.1%), NA = 78	5 (10.0%), NA = 45	22 (10.6%)	17 (11,7%)	47 (100%)	31 (100%)

3.2 Ergebnisse der Zytokinbestimmungen

Die Ergebnisse der Zytokinmessungen sind in Tabelle 3.2-3.4 dargestellt. Da die Zytokinkonzentrationen nicht normalverteilt waren, erfolgte eine Transformation der Messwerte mittels Boxcox-Transformation. In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob eine gepoolte Analyse der Zytokinwerte bei Patienten aus dem pädiatrischen Studienarm mit denen aus dem erwachsenen Studienarm der ALLIANCE Kohorte möglich ist. Die zusammengeführten Datensätze wurden dann mit Hilfe des Cosinor Modells daraufhin überprüft, inwieweit saisonale Effekte darstellbar sind und der Einfluss dieser Saisonalität auf mögliche Gruppenunterschiede analysiert.

3.2.1 Gemessene Zytokinkonzentrationen der KIRA und ERA Kohorte

Die Tabellen 3.2 bis 3.4 zeigen die gemessenen Rohwerte der KIRA und der ERA Kohorte für jedes der 27 gemessenen Zytokine: Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL17A, IL-1 β , IL-ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-bb, RANTES, TNF- α und VEGF. Dabei sind Minimum, Maximum, Median, 1. und 3. Quartil getrennt nach Altersgruppen und Wheezer/Asthmatiker bzw. gesunde Kontrollen dargestellt.

Tabelle 3.2 Rohwerte der gemessenen Zytokine KIRA <6 Jahre (G=Gesund, W=Wheeze) in pg/ml. Darstellung von Minimum (Min.), Maximum (Max.), 1. und 3. Quartil (Qu.) und Median (Med.).

	G_Min.	W_Min.	G_1st Qu.	W_1st Qu.	G_Med.	W_Med.	G_3rd Qu.	W_3rd Qu.	G_Max.	W_Max.
Eotaxin	35,39	12,48	43,04	45,49	57,22	60,33	68,09	70,53	145,65	130,61
FGF basic	3,86	1,14	14,94	4,02	39,99	14,94	68,6	64,51	160,41	192,12
G-CSF	23,09	3,53	51,98	59,43	66,8	77,3	92,17	107,7	160,69	272,58
GM-CSF	0,68	0,67	3,22	2,97	3,3	8,94	11,17	11,22	58,93	65,75
IFN-g	89,33	5,74	99,8	88,25	156,68	160,2	194,89	207,01	375,17	480,24
IL-10	2,13	1,91	4,04	2,16	12,36	13,47	15,66	18,45	38,29	65,59
IL-12(p70)	2,34	2,31	15,75	14,4	21,35	23,2	38,4	49,81	60,87	258,25
IL-13	0,43	0,38	3,69	3	4,64	4,76	5,15	7,68	19,09	20,86
IL-15	1,13	1,13	5,66	1,29	5,89	5,13	6,17	6,07	35,48	79,11
IL-17A	32,15	1,37	73,09	42,48	172,9	63,33	292,49	104,11	442,34	584,37
IL-1b	0,5	0,47	2,42	2,44	4,34	5,01	6,48	6,09	12,44	12,33
IL-1ra	50,04	4,86	85,35	66,89	101,57	104,2	130,07	144,46	247,66	440,04
IL-2	1,22	1,11	1,23	1,23	3,61	3,61	4,61	4,72	4,72	183,58
IL-4	4,1	0,25	6,89	3,9	7,87	7,14	9,57	9,2	12,9	13,5
IL-5	1,37	1,23	8,43	6,42	10,61	11,13	18	17,36	51,42	5070,02
IL-6	2,3	1,61	2,3	2,3	11,93	12,93	15,45	15,66	28,53	384,88
IL-7	0,89	0,89	8,39	7,2	10,28	10,24	14,46	13,96	22,92	90,35
IL-8	15,05	2,4	25,56	22,93	32,67	35	49,67	46,66	65,33	78,89
IL-9	18,32	5,24	32,02	21,06	47,1	30,21	72,06	58,2	94,63	113
IP-10	130,49	15,64	219,96	231,38	282,38	349,55	401,09	571,85	1507,87	3094,28
MCP-1(MCAF)	1,3	1,3	1,39	1,57	9,68	16,49	23,52	23,52	45,56	85,86
MIP-1a	1,65	0,14	4,6	4,34	5,62	6,22	7,82	7,57	12,24	167,89
MIP-1b	59,16	3,79	77,8	81,84	100,66	116,25	178,83	160,32	299,27	338,27
PDGF-bb	1212,31	9,2	2235,37	2621,57	3031,77	3281,03	3683,73	4059,15	5312,09	8183,87
RANTES	10741,97	4,01	13348,67	4107,45	17086,24	11223,92	22574,2	14323,46	33029,74	50385,37
TNF-a	25,83	3,76	45,16	27,47	66,64	60,86	89,09	83,41	126,88	147,42
VEGF	1,87	1,88	22,25	14,68	44,99	32,34	74,78	76,21	136,63	268,94

Tabelle 3.3 Rohwerte der gemessenen Zytokine KIRA ≥ 6 Jahre (G=Gesund, A=Asthma) in pg/ml. Darstellung von Minimum (Min.), Maximum (Max.), 1. und 3. Quartil (Qu.) und Median (Med.).

	G_Min.	A_Min.	G_1st Qu.	A_1st Qu.	G_Med.	A_Med.	G_3rd Qu.	A_3rd Qu.	G_Max.	A_Max.
Eotaxin	25,01	1,72	39,99	40,8	50,68	51,04	60,36	62,97	139,89	305,77
FGF basic	1,14	1,14	25,47	14,94	63,52	63,14	85,58	90,59	135,76	226,43
G-CSF	50,88	3,53	69,73	60,21	84,63	83,84	130,15	121,94	266,29	979,93
GM-CSF	0,67	0,67	3,22	2,97	3,69	6,35	11,01	12,71	14,28	95,53
IFN-g	25,56	33,68	70,23	85,29	99,8	124,5	144,24	228,97	311	6447,84
IL-10	2,1	1,91	2,15	8,87	12,34	13,7	16,8	24,5	699	1658,24
IL-12(p70)	2,31	2,31	21,59	25,5	32,89	44,31	51,81	70,39	716,94	1060,38
IL-13	0,42	0,38	3,18	3,81	4,5	6,4	5,92	9,43	11,02	126,88
IL-15	1,13	1,13	1,25	1,39	5,13	5,13	5,89	6,17	6,17	23,51
IL-17A	23,01	1,37	65,68	53,16	85,02	89,05	187,24	172,47	387,42	497,52
IL-1b	0,47	0,47	2,45	2,04	3,02	3,34	5,35	5,14	9,27	151,18
IL-1ra	41,97	4,86	79,64	56,89	94,29	99,97	112,29	151,19	333,61	14867,43
IL-2	1,11	1,11	1,22	1,23	4,11	4,61	4,72	4,74	33,89	467,04
IL-4	1,5	0,25	2,54	3,36	5,17	5,06	8,27	7,02	11,63	28,67
IL-5	1,23	1,27	6,53	6,42	9,84	15,2	13,23	29,18	29,78	5070,02
IL-6	1,64	1,61	2,3	1,75	7,19	6,55	14,38	13,69	46,51	1141,84
IL-7	4,5	1,03	8,07	9,63	9,16	11,89	11,85	17,06	18,86	66,38
IL-8	11,21	2,4	21,68	19,32	26,44	27,93	37,34	38,57	73,1	69,24
IL-9	8,16	1,22	27,37	25,06	40,47	52,14	61,53	66,78	128,06	128,89
IP-10	90,23	58,2	169,3	191,93	217,71	258,44	444,77	402,15	763,07	2055,54
MCP-1(MCAF)	1,3	1,3	1,72	1,57	8,1	12,71	23,25	26,8	40,35	185,46
MIP-1a	0,62	0,5	5,1	4,11	5,93	5,88	7,94	7,96	19,48	682,47
MIP-1b	36,65	23,76	64,44	60,79	81,97	83,69	102,69	107,62	339,4	248,27
PDGF-bb	1226,68	1058,75	2009,36	2467,89	2556,72	3055,25	3359,35	3712,17	4661,98	6818,85
RANTES	1009,93	1009,93	11950,39	4107,45	19862,26	4812,81	28877,46	17509,68	54629,77	59343,24
TNF-a	18,76	3,76	36,23	21,5	46,16	44,02	66,69	62,88	322,15	762,21
VEGF	1,88	1,87	14,42	18,5	27,52	41,37	45,92	75,54	120,04	269,71

Tabelle 3.4 Rohwerte der gemessenen Zytokine ERA (G=Gesund, A=Asthma) in pg/ml. Darstellung von Minimum (Min.), Maximum (Max.), 1. und 3. Quartil (Qu.) und Median (Med.).

	G_Min.	A_Min.	G_1st Qu.	A_1st Qu.	G_Med.	A_Med.	G_3rd Qu.	A_3rd Qu.	G_Max.	A_Max.
Eotaxin	17,44	6,25	39,03	35,62	55,04	48,33	63,14	66,09	133,47	330,38
FGF basic	2,88	2,88	3,18	2,88	3,8	4,03	4,03	32,17	71,4	290,05
G-CSF	25,67	1,76	41,24	38,1	50,37	57,44	76,61	75,01	435,74	725,22
GM-CSF	2,32	2,32	2,72	2,72	10,67	12,12	39,94	39,94	39,95	39,95
IFN-g	31,92	17,47	41,65	42,9	46,63	50,14	53,66	54,3	71,38	327
IL-10	3,33	3,33	3,4	3,44	3,51	3,83	9,22	16,95	25,83	867,53
IL-12(p70)	2,27	2,25	2,37	2,37	2,56	10,08	17,93	22,48	55,77	634,06
IL-13	0,34	0,32	0,35	0,35	1,71	1,72	2,34	3,03	5,46	49,64
IL-15	1,45	1,45	1,92	1,92	6,21	6,21	6,99	6,99	7,69	177,07
IL-17A	8,96	1,71	29,89	30,68	41,41	47,01	59,95	67,79	96,78	225,01
IL-1b	2,42	0,32	2,83	2,87	3,18	3,37	3,65	3,97	4,94	41,86
IL-1ra	39,08	7,27	48,92	55,11	56,19	66,6	63,36	81,15	79,35	1652,04
IL-2	0,53	0,53	2,04	2,04	2,08	2,08	9,39	9,39	34,35	131,83
IL-4	3,57	0,77	5,03	4,8	5,77	5,56	6,1	6,26	6,92	8,82
IL-5	0,69	0,69	3,38	3,11	4,52	4,25	6,26	6,4	27,36	49,77
IL-6	6,09	1,4	7,36	8,03	8,5	9,3	8,98	10,95	10,81	110,52
IL-7	2,43	0,56	5,08	5,01	7,11	7,62	8,69	10,53	30,6	171,38
IL-8	22,25	11,56	29,06	29,8	35,13	34,68	38,73	42,42	177,97	89,43
IL-9	1,33	1,33	9,04	9,81	12,42	12,57	14,73	17,44	28,91	1564,68
IP-10	139,45	74,08	218,74	187,7	240,18	262,44	295,04	369,88	483,2	1336,46
MCP-1(MCAF)	3,22	3,22	3,35	3,35	3,98	3,83	13,48	13,48	13,72	415,31
MIP-1a	1,1	0,25	3,64	3,81	4,49	5,5	6,7	7,76	22,2	34,93
MIP-1b	22,43	28,2	70,47	69,62	89,39	86,3	118,72	112,16	162,21	254,65
PDGF-bb	1045,02	582,41	2461,74	2419,9	3042,83	2924,53	3739,68	3657,96	8156,22	7892,73
RANTES	895,81	895,81	906,53	906,53	14586,24	8984,54	24586,93	25353,05	38634,34	51027,42
TNF-a	30,75	2,95	38,7	40,16	45,69	46,96	49,33	53,39	66,28	709,33
VEGF	2,01	2,01	2,44	2,51	2,83	9,96	31,34	39,08	107,79	163

3.2.2 Transformation der Daten

Mit dem Ziel gängige Verfahren zur Analyse statistischer Daten verwenden zu können, wurde eine Normalverteilung der Messdaten angestrebt. Einige Zytokine (u.a. IL-7, IL-17A und G-CSF, siehe Abbildung 3.2) zeigen aufgrund insgesamt sehr niedriger Serumkonzentrationen eine linksverschobene Häufung der Messwerte. Diese linkslastigen Verteilungen können durch statistische Transformation geglättet werden.

In Form von Balkendiagrammen erfolgte die Darstellung der Verteilung der Zytokinkonzentrationen für jedes einzelne Zytokin in vier unterschiedlichen Varianten: unangepasst, winsorisiert, boxcox-transformiert, kombiniert winsorisiert und boxcox- transformiert. Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft die Verteilung der Serumkonzentrationen für G-CSF in den vier Varianten.

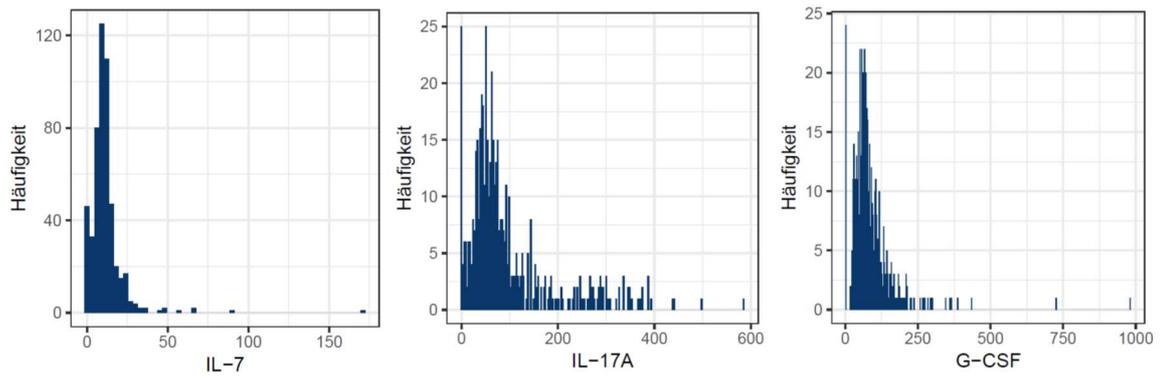


Abbildung 3.2 Beispiel Histogramme der Rohwerte von IL-7, IL-17A und G-CSF mit linksverschobener Verteilung der Messwerte aufgrund insgesamt sehr niedriger Serumkonzentrationen. Darstellung der Zytokinkonzentration in pg/ml auf der x-Achse und Frequenz auf der der y-Achse.

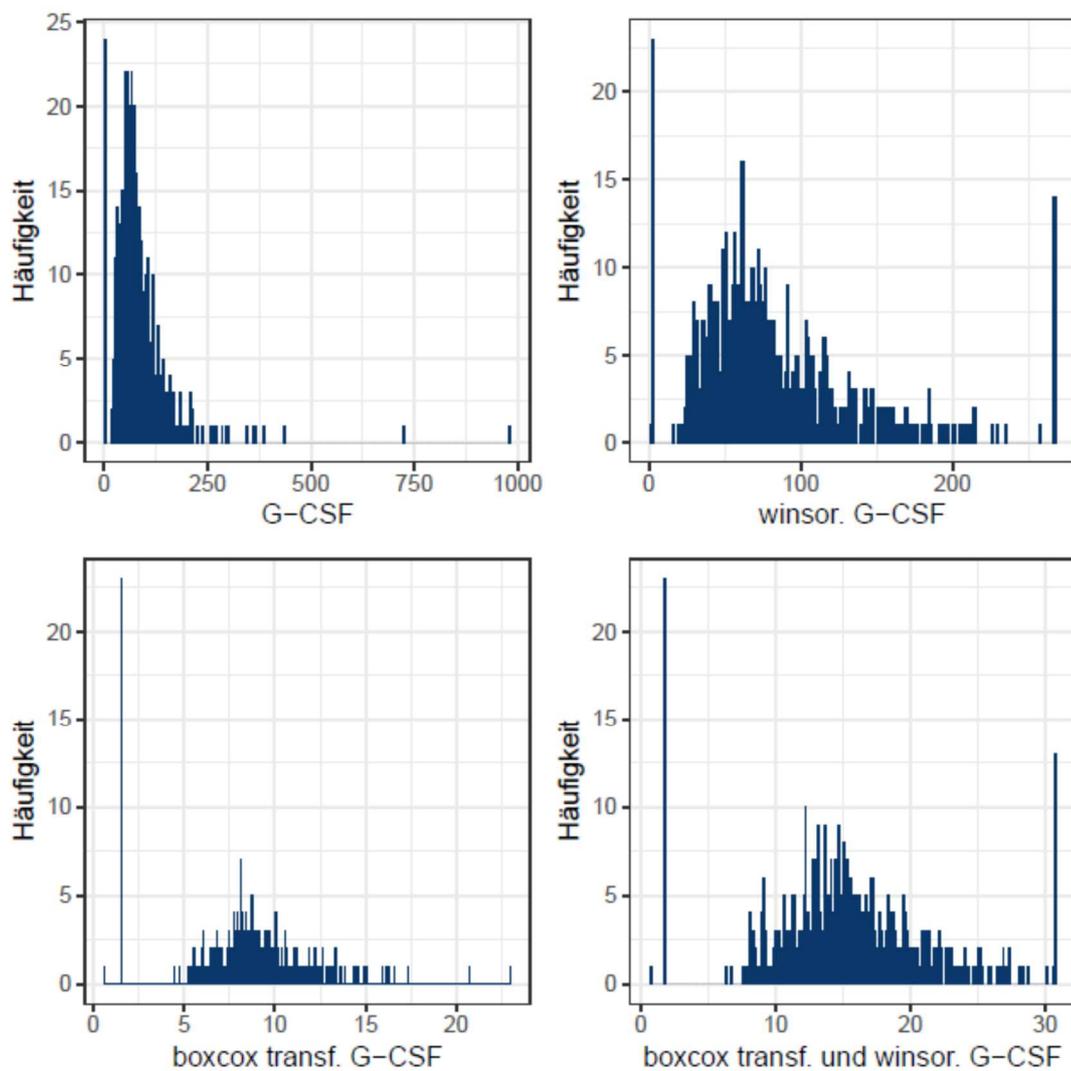
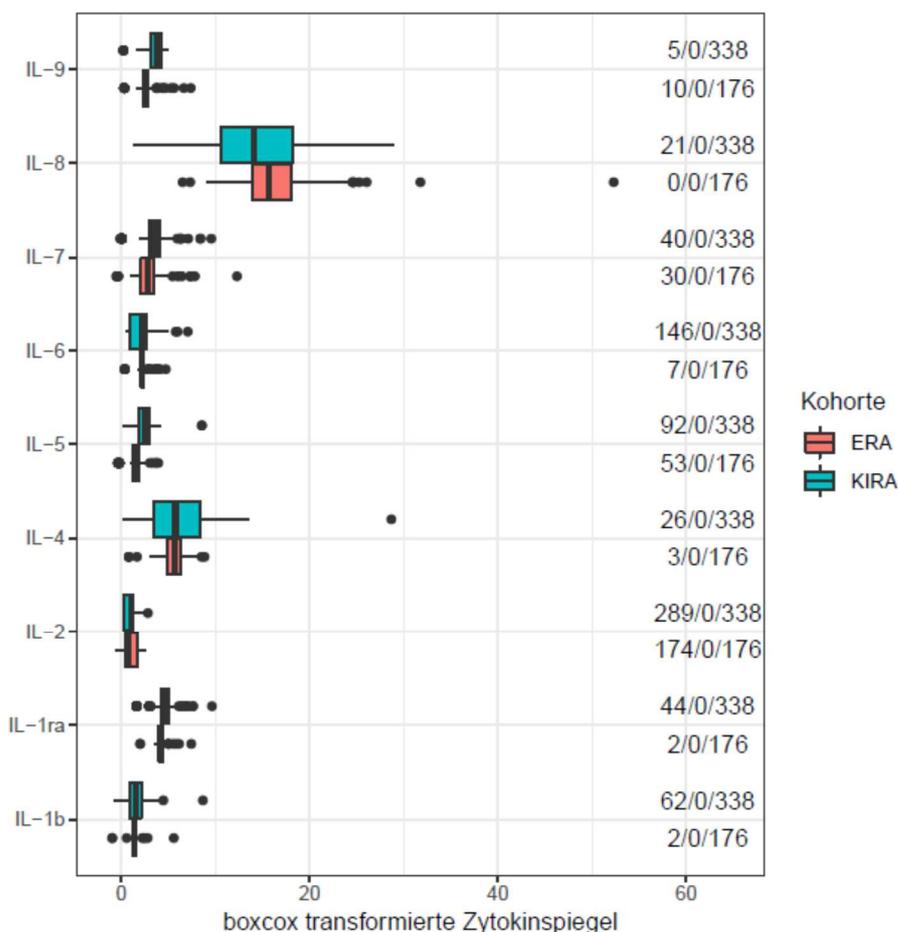


Abbildung 3.3 Histogramme G-CSF: unangepasst, winsorisiert, boxcox-transformiert, kombiniert winsorisiert und boxcox-transformiert. Darstellung der Zytokinkonzentration auf der x-Achse und Frequenz auf der der y-Achse.

Auf Grundlage der vorliegenden Histogramme wurde entschieden, für die weiteren Analysen die boxcox-transformierten Daten zu verwenden, da hiermit insgesamt über alle Zytokine hinweg die Normalverteilung am besten realisiert werden konnte.

3.2.3 Vergleich der KIRA und ERA Daten

Zur Überprüfung, ob eine gemeinsame Analyse der Daten inhaltlich sinnvoll umsetzbar ist, wurden die Zytokindaten Erwachsener und Kinder bzw. Jugendlicher miteinander verglichen. Hierfür wurden die jeweiligen Zytokinkonzentrationen der ERA und KIRA Probanden in Form von Boxplots dargestellt (Abbildung 3.4). Aufgrund der guten Übereinstimmung der Zytokinkonzentrationen wurden für die Saisonalitätsanalysen die Zytokindaten der gesamten ALLIANCE Kohorte verwendet.



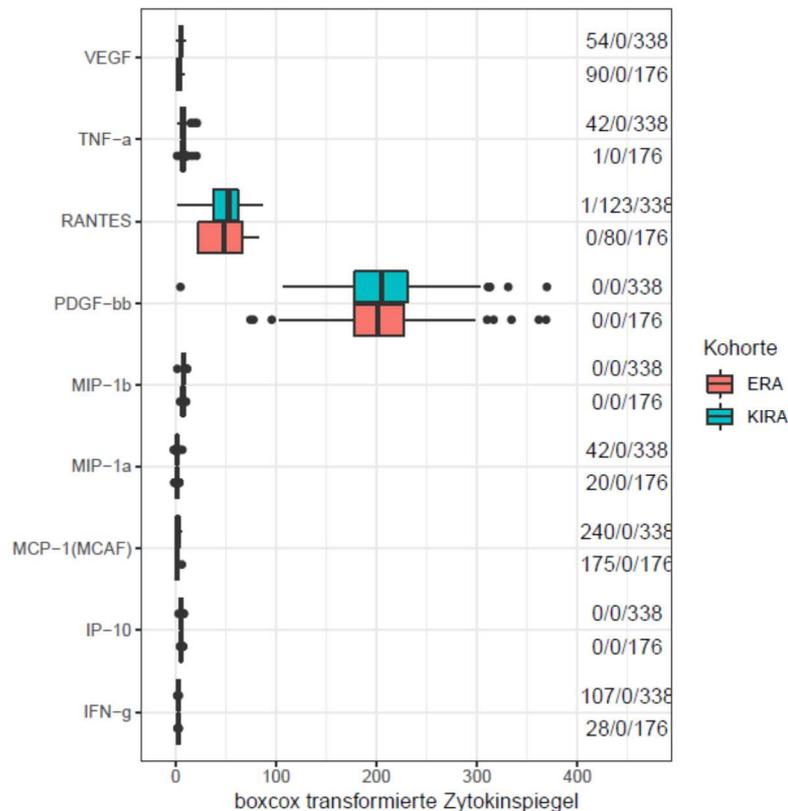
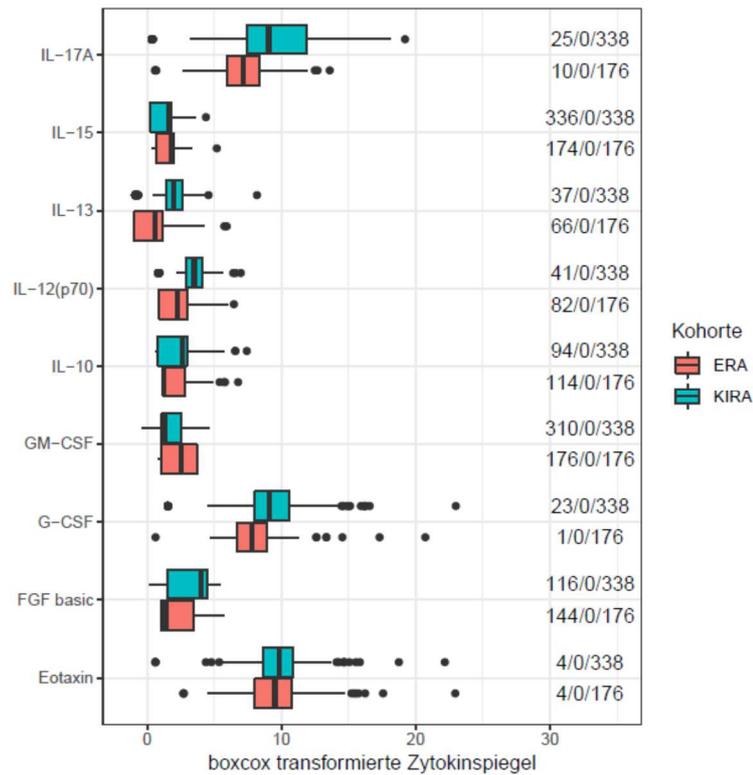


Abbildung 3.4 Boxcox-transformierte Zytokinkonzentrationen in ERA (rot) und KIRA (türkis). Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze vertikale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. In der rechten Spalte (x/y/z) finden sich die Angaben für x = Anzahl der Proben unterhalb der unteren Nachweisgrenze, y = Anzahl der Proben oberhalb der oberen Nachweisgrenze und z = Gesamtanzahl.

In Tabelle 3.5 sind die zusammengeführten Zytokindaten der KIRA und ERA Kohorte über die gemessenen Serumkonzentrationen der jeweiligen Zytokine sowie deren Verteilung nach erfolgter Boxcox-Transformation dargestellt.

Tabelle 3.5 Überblick über die gemessenen, boxcox-transformierten Zytokinkonzentrationen – Median, Mittelwert, Minimum, Maximum, 1. Und 3. Quartil und Anzahl der Proben insgesamt sowie Anzahl der Proben mit einem Wert unter bzw. oberhalb der Nachweisgrenze (<, > LOD).

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	<,> LOD	total
IL-1b	0.32	2.85	3.32	3.68	3.91	41.86	64	514
IL-1ra	7.27	53.00	64.16	81.72	78.01	1652.04	46	514
IL-2	0.53	2.04	2.08	9.34	9.39	131.83	463	514
IL-4	0.77	4.80	5.62	5.52	6.22	8.82	29	514
IL-5	0.69	3.11	4.30	5.54	6.42	49.77	145	514
IL-6	1.40	7.91	9.09	10.80	10.40	110.52	153	514
IL-7	0.56	5.01	7.44	9.56	10.31	171.38	70	514
IL-8	11.56	29.79	34.78	37.33	41.91	177.97	21	514
IL-9	1.33	9.75	12.52	30.27	16.32	1564.68	15	514
IL-10	3.33	3.44	3.51	21.83	16.25	867.53	208	514
IL-12(p70)	2.25	2.37	9.57	25.53	20.38	634.06	123	514
IL-13	0.32	0.35	1.72	2.97	2.83	49.64	103	514
IL-15	1.45	1.92	6.21	6.27	6.99	177.07	510	514
IL-17A	1.71	30.20	45.07	51.85	65.95	225.01	35	514
Eotaxin	6.25	36.28	50.62	56.09	64.58	330.38	8	514
FGF basic	2.88	2.88	3.91	20.04	32.00	290.05	260	514
G-CSF	1.76	39.31	55.08	68.79	76.49	725.22	24	514
GM-CSF	2.32	2.72	12.12	18.19	39.94	39.95	486	514
IFN-g	17.47	42.09	50.14	51.18	53.83	327.00	135	514
IP-10	74.08	196.32	256.40	312.40	351.63	1336.46	0	514
MCP-1(MCAF)	3.22	3.35	3.83	9.05	13.48	415.31	415	514
MIP-1a	0.25	3.73	5.34	6.36	7.50	34.93	62	514
PDGF-bb	582.41	2429.95	2993.34	3121.55	3666.44	8156.22	0	514
MIP-1b	22.43	69.35	86.69	93.91	113.81	254.65	0	514
RANTES	895.81	906.53	8994.35	13849.18	25290.48	51027.42	204	514
TNF-a	2.95	39.20	46.48	54.45	53.39	709.33	43	514
VEGF	2.01	2.51	9.43	25.47	37.18	163.00	144	514

3.2.4 Saisonalitätsanalysen mittels Cosinor Model

Die Zytokinkonzentrationen wurden im Folgenden auf Saisonalität hin mittels Cosinor Model getestet. Ein Messwert über- oder unterhalb der Nachweisgrenze wurde für die weiteren Analysen auf den Wert der Nachweisgrenze gesetzt. Folgende Zytokine wurden aufgrund eines über 20%igem Anteils von Messungen über- oder unterhalb der Nachweisgrenze für die weiteren Analysen nicht weiter untersucht: IL-2, -5, -6, -10, -12, -15, FGF-basics, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, RANTES und VEGF. Signifikante saisonale Effekte mit einem Signifikanzlevel von 0.025 konnten für das Th2 typische Zytokin IL-4, welches für die Differenzierung und die Expression von IgE von Bedeutung ist, aber auch für die proinflammatorischen Zytokine IL1 β und TNF- α gezeigt werden [2]. Auch die Th9 bzw. Th17 typischen Zytokine IL-9 und IL-17A sowie das antiinflammatorische IL-1ra und MIP-1 β zeigen

saisonale Schwankungen im Cosinor Model. Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen den zeitlichen Verlauf der gemessenen Serumkonzentrationen.

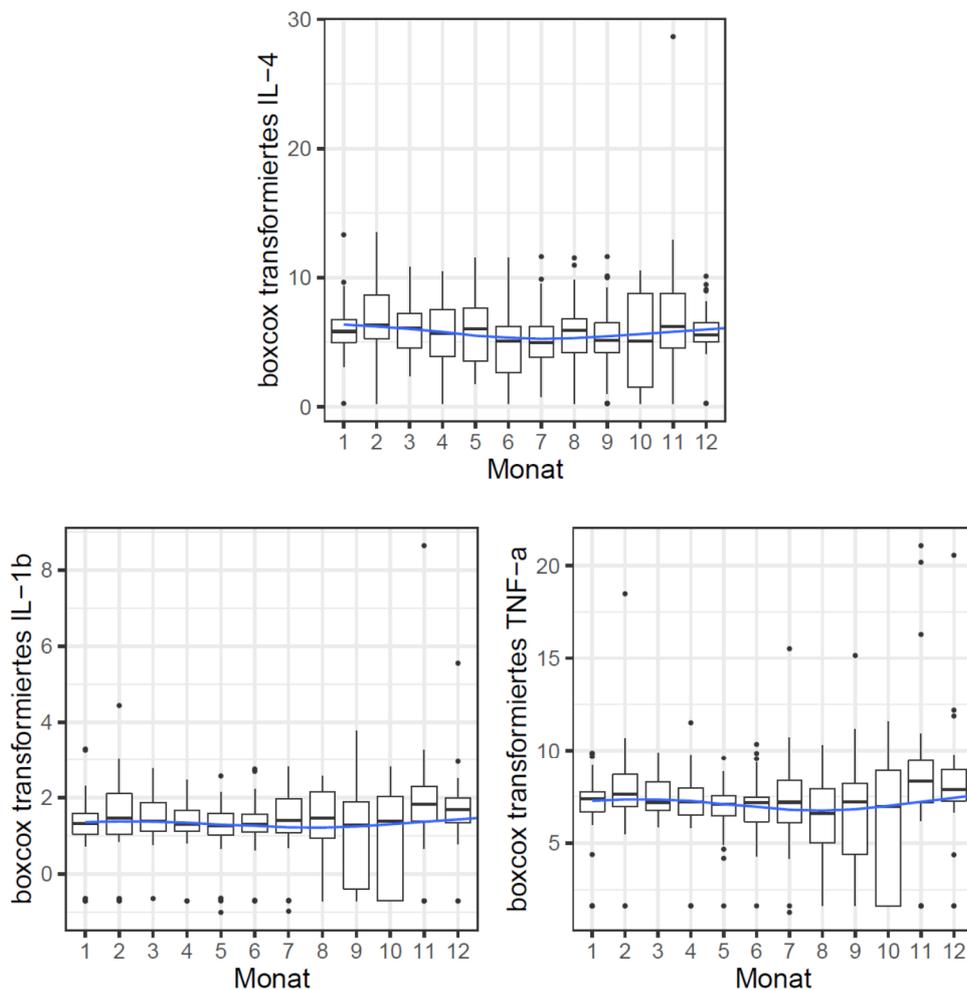


Abbildung 3.5 Saisonalität von IL-4, IL-1 β und TNF- α Konzentrationen in 514 Probanden bei Baseline Visite. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. Die Sinuskurve wurde mittels Cosinor Model ermittelt und spiegelt die jährlichen durchschnittlichen Konzentrationen je nach Monat wieder (Significant seasonality based on adjusted significance level of 0.025=TRUE).

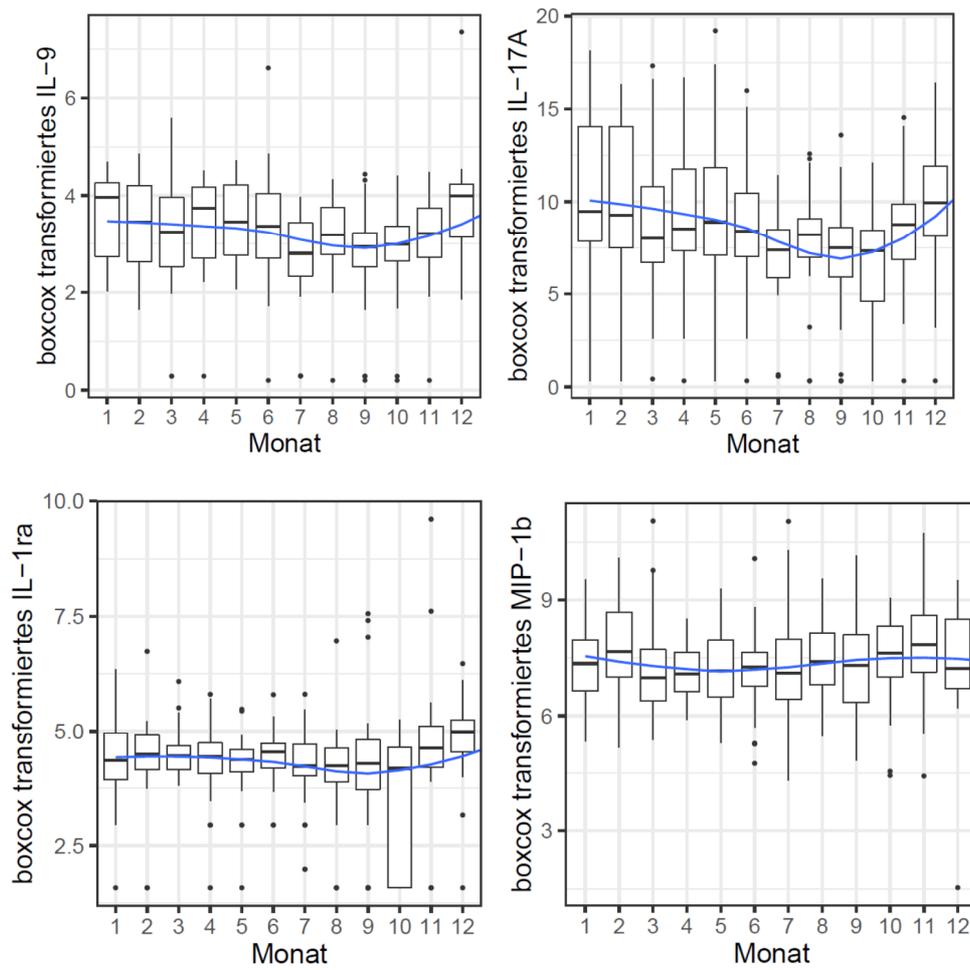


Abbildung 3.6 Saisonalität von IL-9, IL-17A, IL-1ra und MIP-1 β Konzentrationen in 514 Probanden bei Baseline Visite. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. Die Sinuskurve wurde mittels Cosinor Model ermittelt und spiegelt die jährlichen durchschnittlichen Konzentrationen je nach Monat wieder (Significant seasonality based on adjusted significance level of 0.025=TRUE).

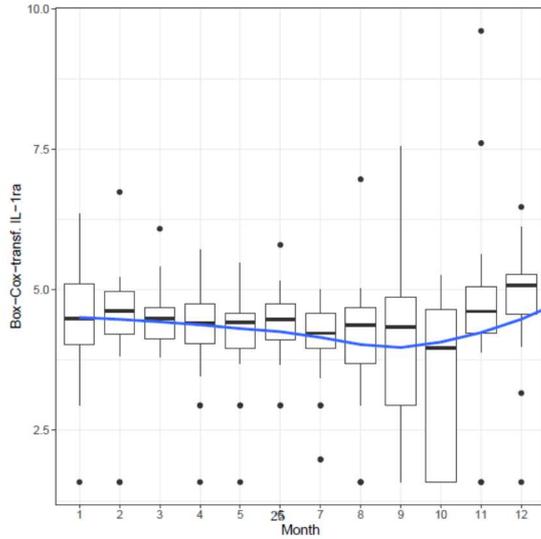
Es sei darauf hingewiesen, dass bei den oben angeführten Analysen die Zytokindaten aller 514 untersuchten Serumproben sowohl von Patienten mit Asthma bronchiale als auch Gesunden herangezogen wurden. Ergänzend wurden daher die Zytokindaten getrennt für Asthmatiker/Wheezer als auch für gesunde Probanden mittels Cosinor Model auf saisonale Schwankungen hin untersucht. Hierbei zeigt sich, dass sowohl bei Asthmatikern als auch gesunden Probanden jahreszeitliche Schwankungen der Zytokine mittels Cosinor Model zu finden sind. Während sich für die Zytokine IL 1 β , IL 4, IL 9, IL 13, IL 17A, Eotaxin, IP 10 und TNF α einheitliche Resultate finden lassen, zeigen IL 7, IL 8 und MIP 1 α erst bei Untersuchung der Daten ausschließlich für Asthmatiker eine Saisonalität. Unterschiedliche Ergebnisse zwischen Asthmatikern und Gesunden ergeben sich für die Zytokine IL 1ra, IL 7, G-CSF, MIP 1 α , PDGF-bb und MIP 1 β (siehe

Abbildungen 3.7 bis 3.9). Für das Interleukin 8, welches insbesondere eine chemotaktische Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bewirkt und damit vor allem als Entzündungsmediator fungiert, findet sich eine gegenläufige saisonale Schwankung in den Zytokindaten. In der Analyse der Daten von Interleukin 8 für Gesunde und Asthmatiker zusammen, ließ sich die Saisonalität mittels Cosinor Model nicht mehr aufzeigen (Siehe Abbildung 3.10). Tabelle 3.6 gibt einen Überblick über die gefundenen Ergebnisse. Aufgrund der geringen Probandenzahl an Gesunden, im Mittel mit einem n kleiner als 10 Probanden pro Monat, wurden für die weiteren statistischen Untersuchungen ausschließlich die Saisonalitätsanalysen der gesamten Subpopulation herangezogen.

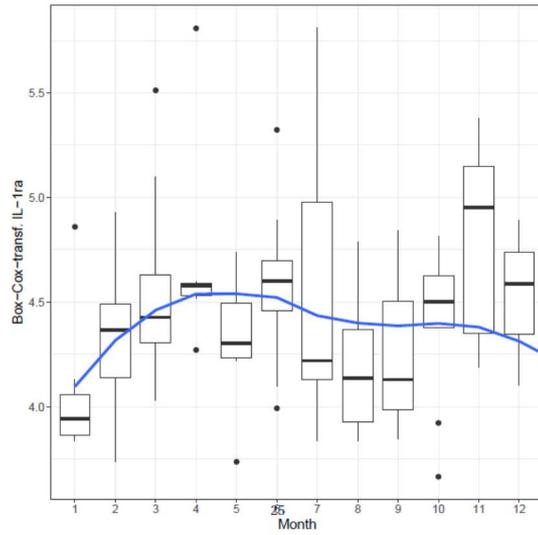
Tabelle 3.6 Überblick über Saisonalität der Zytokine mit einem unter 20%igem Anteil von Messungen über- oder unterhalb der Nachweisgrenze mittels Cosinor Model (Significant seasonality based on adjusted significance level of 0.025=TRUE) – gesamte Subpopulation, Asthmatiker/Wheezer und Gesunde

Zytokine	Saisonalität gesamte Subpopulation (n=514)	Saisonalität Asthmatiker/Wheezer (n=411)	Saisonalität Gesunde (n=103)
IL 1 β	Ja	Ja	Ja
IL 1ra	Ja	Ja	Nein
IL 4	Ja	Ja	Ja
IL 7	Nein	Ja	Nein
IL 8	Nein	Ja	Ja
IL9	Ja	Ja	Ja
IL 13	Nein	Nein	Nein
IL 17A	Ja	Ja	Ja
Eotaxin	Nein	Nein	Nein
G-CSF	Nein	Nein	Ja
IP 10	Nein	Nein	Nein
MIP 1 α	Nein	Ja	Nein
PDGF-bb	Nein	Nein	Ja
MIP 1 β	Ja	Nein	Ja
TNF α	Ja	Ja	Ja

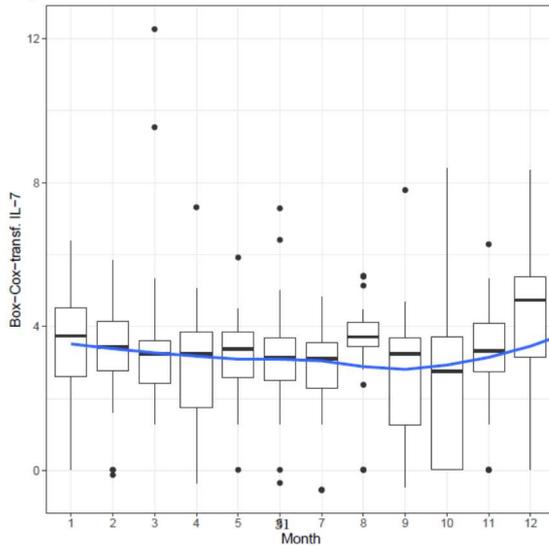
Asthmatiker/Wheezer IL 1ra
(Significance level of 0.025=TRUE)



Gesunde Probanden IL 1ra
(Significance level of 0.025=FALSE)



Asthmatiker/Wheezer IL 7
(Significance level of 0.025=TRUE)



Gesunde Probanden IL 7
(Significance level of 0.025=FALSE)

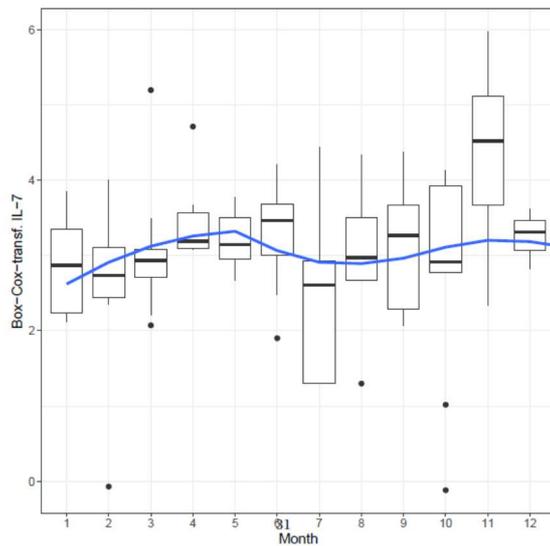
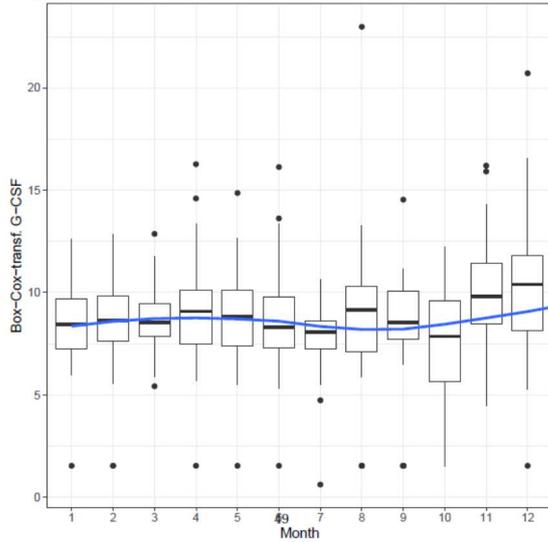
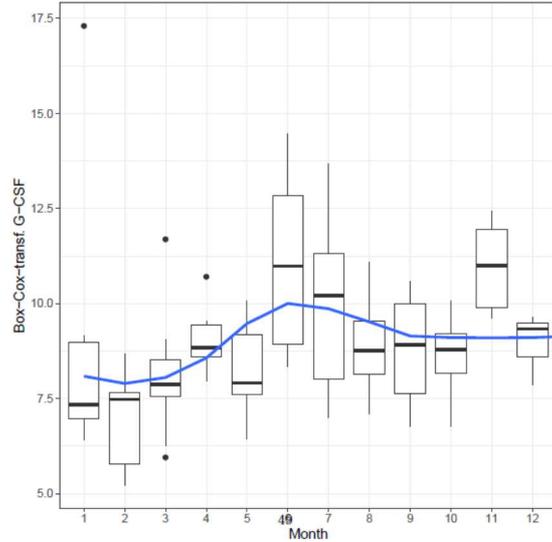


Abbildung 3.7 Saisonalität von IL-1ra und IL 7 Konzentrationen bei Baseline Visite - links n=411 Asthmatiker und rechts n=103 gesunde Probanden. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. Die Sinuskurve wurde mittels Cosinor Model ermittelt und spiegelt die jährlichen durchschnittlichen Konzentrationen je nach Monat wieder.

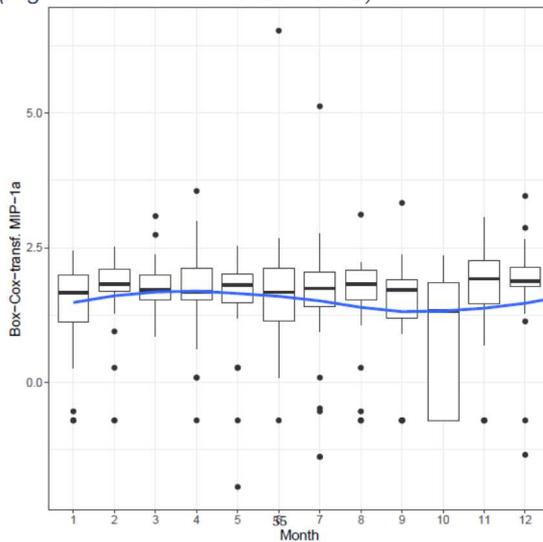
Asthmatiker/Wheezer G-CSF
(Significance level of 0.025=FALSE)



Gesunde Probanden G-CSF
(Significance level of 0.025=TRUE)



Asthmatiker/Wheezer MIP 1 α
(Significance level of 0.025=TRUE)



Gesunde Probanden MIP 1 α
(Significance level of 0.025=FALSE)

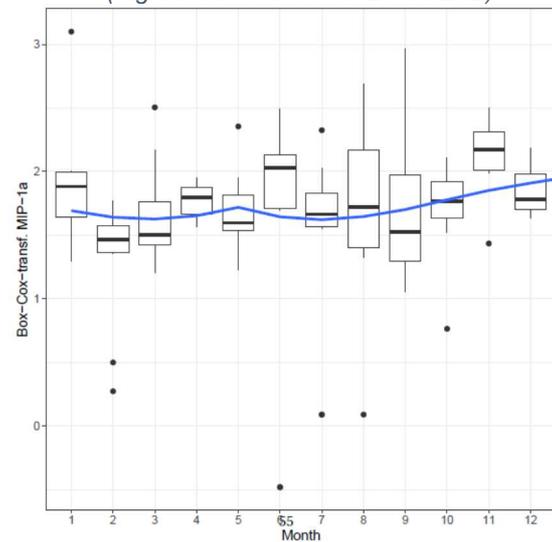
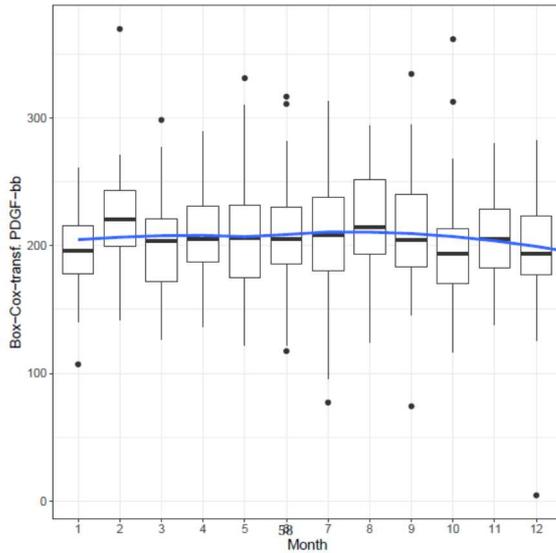
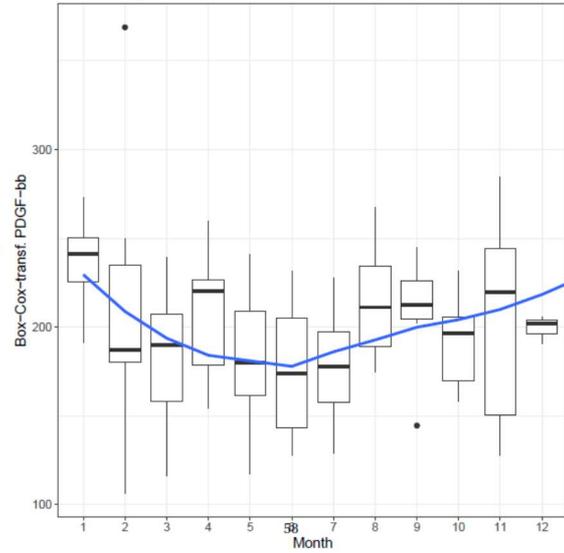


Abbildung 3.8 Saisonalität von G-CSF und MIP 1 α Konzentrationen bei Baseline Visite - links n=411 Asthmatiker und rechts n=103 gesunde Probanden. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. Die Sinuskurve wurde mittels Cosinor Model ermittelt und spiegelt die jährlichen durchschnittlichen Konzentrationen je nach Monat wieder.

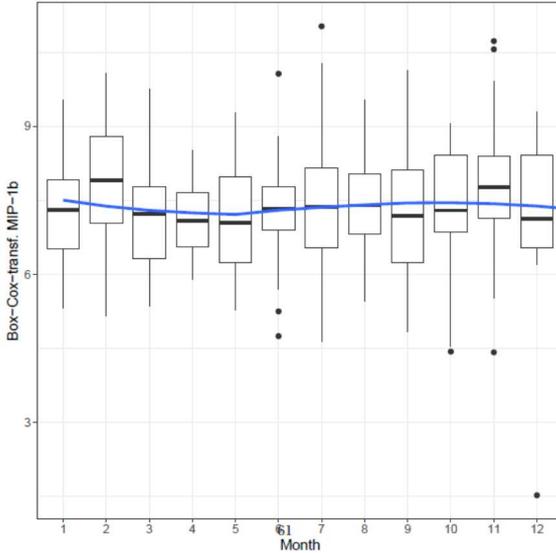
Asthmatiker/Wheezer PDGF-bb
(Significance level of 0.025=FALSE)



Gesunde Probanden PDGF-bb
(Significance level of 0.025=TRUE)



Asthmatiker/Wheezer MIP 1β
(Significance level of 0.025=FALSE)



Gesunde Probanden MIP 1β
(Significance level of 0.025=TRUE)

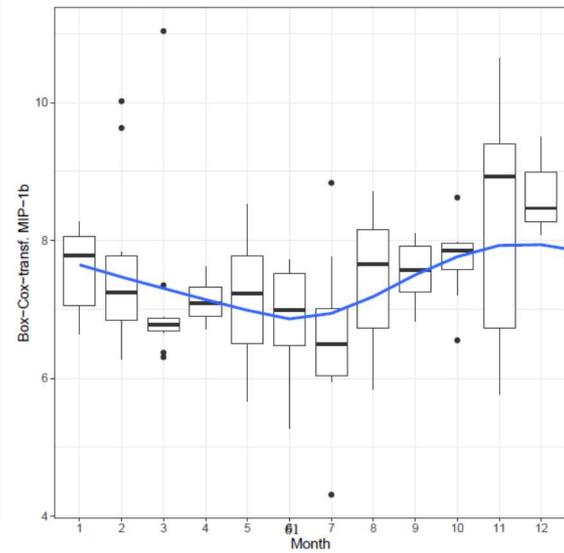
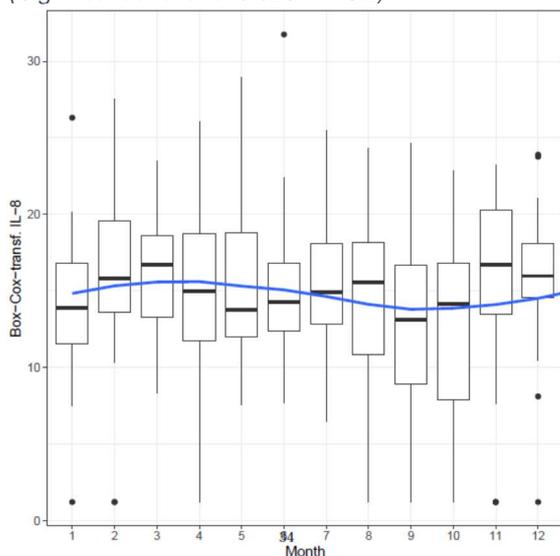
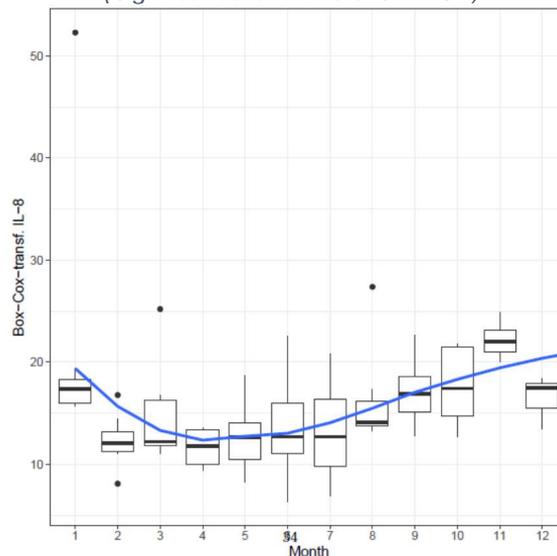


Abbildung 3.9 Saisonalität von PDGF-bb und MIP 1β Konzentrationen bei Baseline Visite - links n=411 Asthmatischer und rechts n=103 gesunde Probanden. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. Die Sinuskurve wurde mittels Cosinor Model ermittelt und spiegelt die jährlichen durchschnittlichen Konzentrationen je nach Monat wieder.

Asthmatiker/Wheezer IL 8
(Significance level of 0.025=TRUE)



Gesunde Probanden IL 8
(Significance level of 0.025=TRUE)



Gesamte Subpopulation (Asthmatiker/Wheezer und Gesunde) - (Significance level of 0.025=FALSE)

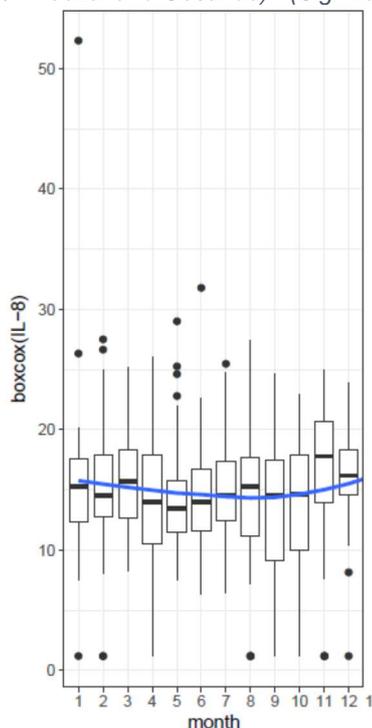


Abbildung 3.10 Saisonalität von Interleukin 8 Konzentrationen bei Baseline Visite – oben links n=411 Asthmatiker, oben rechts n=103 gesunde Probanden, unten n=514 gesamte Subpopulation. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten. Die Sinuskurve wurde mittels Cosinor Model ermittelt und spiegelt die jährlichen durchschnittlichen Konzentrationen je nach Monat wieder.

3.2.5 Untersuchung von Gruppenunterschieden und Saisonalität

Im nächsten Schritt erfolgte eine Untersuchung der Daten in Hinblick auf Gruppenunterschiede zwischen Erkrankten und gesunden Kontrollen mittels U-Test, wobei wie in Kapitel 2.5 angeführt auf eine Korrektur bei multiplen Testen

bewusst verzichtet wurde. Gegenübergestellt wurden die Mediane von Asthmatikern/Wheezern und Gesunden. Zur Überprüfung eines Einflusses jahreszeitliche Schwankungen auf die Gruppenunterschiede wurden diese Werte mit den Ergebnissen von Asthmatikern/Wheezern und Gesunden nach Anpassung an Saisonalität mittels Cosinor Model verglichen. Letzteres wurde ausschließlich für die Zytokine mit positiver Saisonalitätsanalyse der gesamten Subpopulation durchgeführt. Hierbei haben sich dreierlei Einflussmöglichkeiten gezeigt. Zum einen können bei einigen Zytokinen bestehende Gruppenunterschiede nach Prüfung auf Saisonalität nicht mehr aufgezeigt werden und zum anderen können durch Saisonalitätsanpassung Gruppenunterschiede nachträglich sichtbar werden. Es zeigten sich jedoch auch Zytokine, bei denen zwar eine Saisonalität vorhanden ist, diese jedoch keinen Einfluss auf die gefundenen Gruppenunterschiede hatte (siehe auch Tabelle 3.7-3.10).

Die Zytokine PDGF-bb und das Interleukin 7 haben Gruppenunterschiede im U-Test bei Asthmatikern zwischen 6 und 18 Jahren aufgezeigt, eine Saisonalität mittels Cosinor Model konnte hier jedoch nicht gefunden werden (siehe Abbildung 3.11).

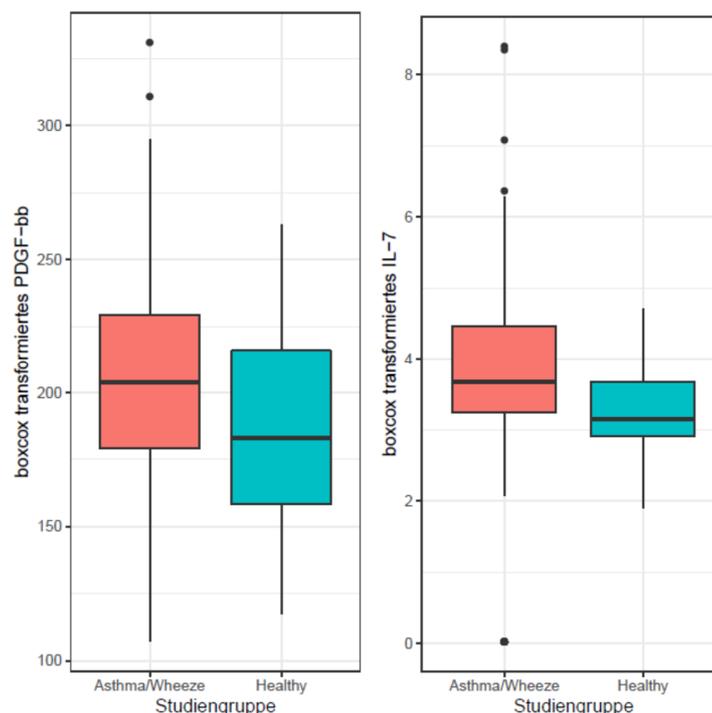


Abbildung 3.11 Gruppenunterschiede für PDGF-bb und IL-7 Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in KIRA ≥ 6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

In den Th2 typischen Zytokinen IL-4 und IL-13 konnten signifikante Gruppenunterschiede ($p < 0.05$) zwischen Kindern mit Asthma bzw. Wheeze und gesunden Kontrollen gezeigt werden. Der Gruppenunterschied bei IL-4 ist nach Anpassung an Saisonalität nicht mehr nachweisbar. Bei Erwachsenen gab es keine nachweisbaren Gruppenunterschiede in den Th2 typischen Zytokinen. Im erwachsenen Studienarm konnte ein signifikanter Gruppenunterschied für das IL-1ra, einem endogenen Inhibitor des pro-inflammatorischen IL-1, gefunden werden. Ebenfalls fanden sich Unterschiede bei Kindern in Zytokinen, die für andere T-Zellen charakteristisch sind, wie z.B. IL-9 und IL-17A. TNF- α , ein Th1 typisches Zytokin, zeigte erst nach Anpassung an Saisonalität einen Gruppenunterschied im pädiatrischen Studienarm. Die Abbildungen 3.12 bis 3.17 zeigen die Gegenüberstellung der Zytokinkonzentrationen von Wheezern/Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden. Ein detaillierter Überblick über die Gruppenunterschiede und die jeweiligen Zytokinwerte findet sich in den Tabellen 3.7-3.9.

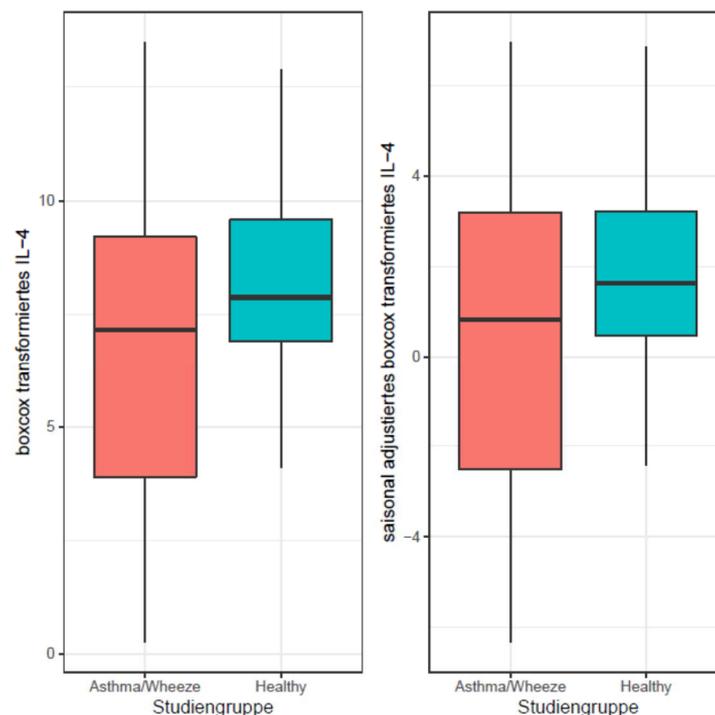


Abbildung 3.12 Gruppenunterschiede für IL-4 Serumkonzentrationen zwischen Wheezern und Gesunden in KIRA <6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

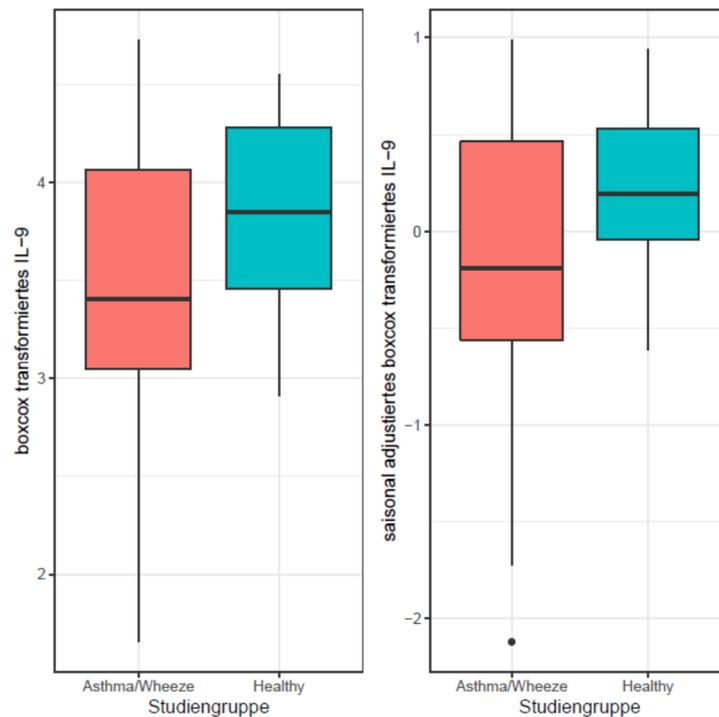


Abbildung 3.13 Gruppenunterschiede für IL-9 Serumkonzentrationen zwischen Wheezern und Gesunden in KIRA <6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

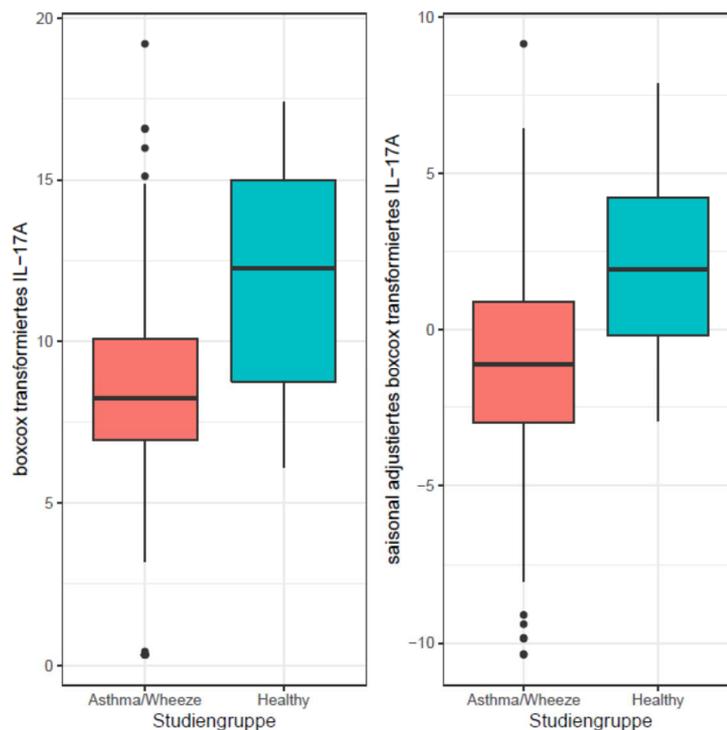


Abbildung 3.14 Gruppenunterschiede für IL-17A Serumkonzentrationen zwischen Wheezern und Gesunden in KIRA <6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

Tabelle 3.7 Darstellung von Gruppenunterschieden mittels U-Test in Zytokinkonzentrationen (Mediane inklusive p-Werte; boxcox-transformiert) der KIRA Wheezer vor und nach Saisonalitätsanpassung der Daten.

Zytokin				saisonalitätsangepasst	
		Wheeze	Kontrolle	Wheeze	Kontrolle
IL-4	N	116	22	116	22
	median (IQR)	7.15 (5.31)	7.87 (2.68)	1.07 (5.63)	1.87 (2.82)
	p healthy vs. wheeze	0.038		0.055	
IL-9	N	116	22	116	22
	median (IQR)	3.41 (1.02)	3.85 (0.82)	0.22 (0.97)	0.5 (0.52)
	p healthy vs. wheeze	0.018		0.076	
IL-17A	N	116	22	116	22
	median (IQR)	8.24 (3.17)	12.26 (6.24)	-0.3 (3.94)	2.67 (4.55)
	p healthy vs. wheeze	3.508e-04		3.144e-04	

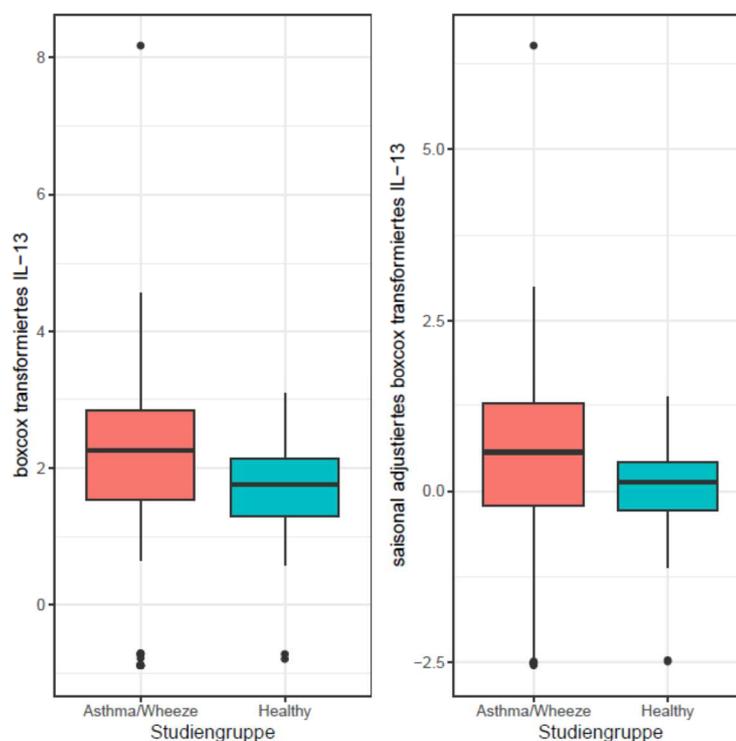


Abbildung 3.15 Gruppenunterschiede für IL-13 Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in KIRA ≥ 6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

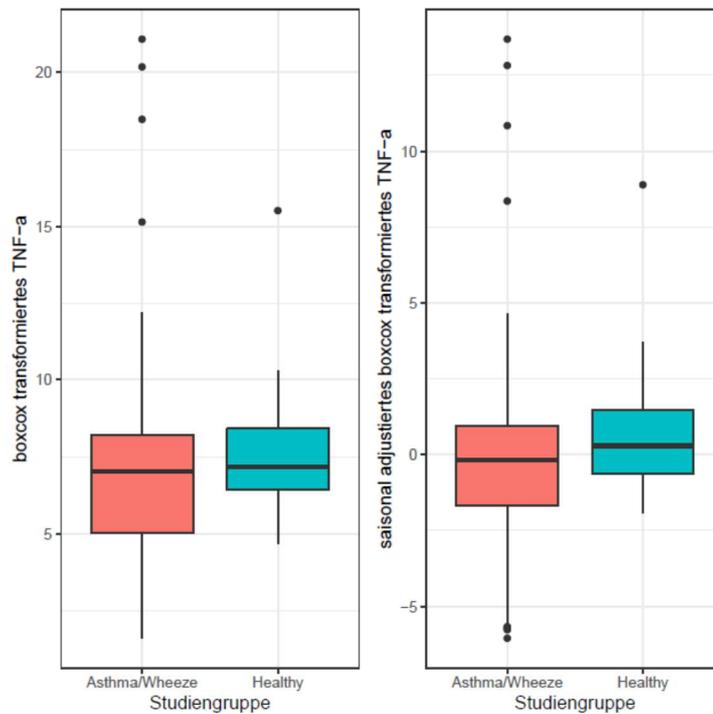


Abbildung 3.16 Gruppenunterschiede für TNF- α Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in KIRA ≥ 6 Jahre basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

Tabelle 3.8 Darstellung von Gruppenunterschieden mittels U-Test in Zytokinkonzentrationen (Mediane inklusive p-Werte; boxcox-transformiert) der KIRA Asthmatischer vor und nach Saisonalitätsanpassung der Daten

Zytokin				saisonalitätsangepasst	
		Asthma	Kontrolle	Asthma	Kontrolle
IL-7	N	150	50		
	median (IQR)	3.67 (1.23)	3.15 (0.76)		
	p healthy vs. Asthma	4.852e-04			
IL-13	N	150	50	150	50
	median (IQR)	2.25 (1.3)	1.75 (0.83)	0.8 (1.39)	0.38 (0.81)
	p healthy vs. Asthma	0.001		0.007	
PDGF-bb	N	150	50		
	median (IQR)	203.86 (50.19)	183.02 (57.73)		
	p healthy vs. Asthma	0.002			
TNF- α	N	150	50	150	50
	median (IQR)	7.04 (3.18)	7.19 (1.97)	-0.24 (2.61)	0.21 (2.08)
	p healthy vs. Asthma	0.225		0.035	

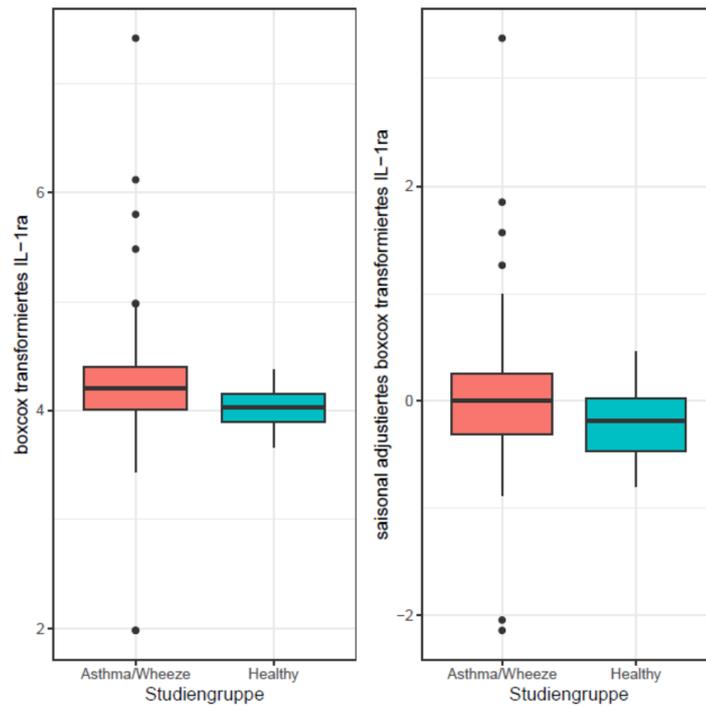


Abbildung 3.17 Gruppenunterschiede für IL-1ra Serumkonzentrationen zwischen Asthmatikern und Gesunden in ERA basierend auf boxcox-transformierten Daten vor und nach Anpassung an Saisonalität. Boxplots zeigen die medianen Serumkonzentrationen als schwarze horizontale Linie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Werte liegen, begrenzt durch das untere und obere Quartil. Die Antennen zeigen das Maximum bzw. Minimum oder den 1.5-fachen Interquartilsabstand und die Ausreißer in Form von Punkten.

Tabelle 3.9 Darstellung signifikanter Gruppenunterschiede in der ERA Kohorte vor und nach Saisonalitätsanpassung der Daten.

Zytokin				saisonalitätsangepasst	
		Asthma	Kontrolle	Asthma	Kontrolle
IL-1ra	N	145	31	145	31
	median (IQR)	4.199 (0.387)	4.029 (0.259)	-0.106 (0.511)	-0.259 (0.417)
	p healthy vs. Asthma	0.001		0.055	

Interleukin 1 β und MIP 1 β scheinen zwar einer saisonalen Schwankung zu unterliegen, zeigen jedoch keinerlei Gruppenunterschiede, so dass eine Untersuchung des Einflusses der Saisonalität auf Gruppenunterschiede hier nicht möglich war. Eine Zusammenfassung der gefundenen Ergebnisse zeigt Tabelle 3.10.

Tabelle 3.10 Zusammenfassung der Analyse der Zytokinkonzentrationen der ALLIANCE Kohorte – Saisonalität, Gruppenunterschiede vor und nach Adjustierung an Saisonalität (na= nicht anwendbar; j= Gruppenunterschied vorhanden; n= kein Gruppenunterschied vorhanden).

Zytokine	<20% OOR	Saisonalität	ERA		KIRA \geq 6 Jahre		KIRA <6 Jahre	
			Nicht adjustiert	adjustiert	Nicht adjustiert	adjustiert	Nicht adjustiert	adjustiert
IL 1 β	Ja	Ja	n	n	n	n	n	n
IL 1ra	Ja	Ja	j	n	n	n	n	n
IL 2	Nein	na	n	na	n	na	n	na
IL 4	Ja	Ja	n	n	n	n	j	n
IL 5	Nein	na	n	na	j	na	n	na
IL 6	Nein	na	j	na	n	na	n	na
IL 7	Ja	Nein	n	na	j	na	n	na
IL 8	Ja	Nein	n	na	n	na	n	na
IL 9	Ja	Ja	n	n	n	n	j	n
IL 10	Nein	na	n	na	j	na	n	na
IL 12	Nein	na	n	na	n	na	n	na
IL 13	Ja	Nein	n	na	j	na	n	na
IL 15	Nein	na	n	na	j	na	n	na
IL 17A	Ja	Ja	n	n	n	n	j	j
Eotaxin	Ja	Nein	n	na	n	na	n	na
FGF basic	Nein	na	n	na	n	na	n	na
G-CSF	Ja	Nein	n	na	n	na	n	na
GM-CSF	Nein	na	n	na	n	na	n	na
IFN- γ	Nein	na	n	na	j	na	n	na
IP 10	Ja	Nein	n	na	n	na	n	na
MCP-1	Nein	na	n	na	n	na	n	na
MIP 1 α	Ja	Nein	n	na	n	na	n	na
PDGF-bb	Ja	Nein	n	na	j	na	n	na
MIP 1 β	Ja	Ja	n	n	n	n	n	n
RANTES	Nein	na	n	na	j	na	j	na
TNF- α	Ja	Ja	n	n	n	J	n	n
VEGF	Nein	na	n	na	j	na	n	na

4. Diskussion

Zytokine sind Proteine, die als extrazelluläre Botenstoffe das Wachstum sowie Differenzierung von Zellen regulieren und maßgeblich an immunologischen Reaktionen und Entzündungsprozessen beteiligt sind [61]. Für das Asthma bronchiale spielen sie eine Rolle zum Verständnis der Pathophysiologie, zur Beschreibung von Endotypen und zur Vorhersage des Ansprechens auf bestimmte Therapien (z.B. monoklonale Antikörper).

Für eine gezielte und personalisierte Therapie des Asthma bronchiale rücken vor allem die Beschreibung von Endotypen in den Fokus der Forschung und damit auch die Quantifizierung von Zytokinen in verschiedensten Biomaterialien wie z.B. Serum, Zellkulturüberständen, induzierten Sputum oder einer bronchoalveolären Lavage.

Hierbei ist die Saisonalität in der Analyse von Zytokinen bislang nicht berücksichtigt worden. Ungeachtet eventuell bestehender saisonaler Schwankungen in Zytokinkonzentrationen wurden die Messwerte zur Ermittlung etwaiger Gruppenunterschiede verwendet. Unsere Arbeit konnte jedoch zeigen, dass ein Einfluss saisonaler Effekte auf Serumzytokinkonzentrationen von Asthmatikern/Wheezern und gesunden Kontrollen sowohl im Kindes- als auch Erwachsenenalter besteht. Darüber hinaus zeigt sich, dass eine Anpassung der Zytokinkonzentrationen an Saisonalität einen entscheidenden Einfluss auf die Aussage über Gruppenunterschiede zwischen Asthmatikern/Wheezern und gesunden Kontrollen hat (z.B. IL-4 und TNF- α). Die Evaluation geeigneter statistischer Methoden zur Anpassung an Saisonalität von Zytokinkonzentrationen ist demnach wichtig.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Hypothese, dass saisonale Schwankungen der Zytokinkonzentrationen existieren und die Berücksichtigung einer solchen Saisonalität eine wichtige Bedeutung für die Untersuchung von Gruppenunterschieden zukommt. Dabei wurde das Cosinor Model auf seine Eignung zur Ermittlung eben solcher saisonaler Effekte hin untersucht. Hierfür haben wir die Daten unserer All-Asthma-Age-Kohorte (ALLIANCE) auf saisonale Schwankungen von Serumzytokinen hin untersucht.

Die Alliance-Kohorte hat seit 2013 über das ganze Jahr verteilt Patienten und gesunde Kontrollen rekrutiert. Für die Analyse der Serumzytokine wurden 514 Serumproben mit dem Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay untersucht,

der die Analyse von 27 verschiedenen Zytokinen umfasst. Von den 27 Zytokinen lagen bei 15 Zytokinen mindestens 80% der Messergebnisse innerhalb der Nachweisgrenzen. Die 12 Zytokine, bei denen weniger als 80% innerhalb der Nachweisgrenzen lagen wurden für die weiteren Analysen ausgeschlossen. Für diese 12 Zytokine, zu denen u.a. IL-2, -5, -6, -10, -12 und IFN- γ zählten, kann hier keine valide Aussage zu einer eventuell vorhandenen Saisonalität getroffen werden. Die boxcox-transformierten Werte des pädiatrischen sowie erwachsenen Studienarmes zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung, so dass für die Folgeanalysen die Zytokindaten der gesamten Studienpopulation verwendet wurden. Hierbei zeigte sich eine Saisonalität bei sieben der 15 untersuchten Zytokine: IL-4, IL1 β , TNF- α , IL-9, IL-17A, IL-1ra und MIP-1 β (Signifikanzniveau von 0.025 im Cosinor Model).

In einer differenzierteren Betrachtung der Daten auf Saisonalität, getrennt für Asthmatiker/Wheezer und gesunde Probanden, konnten wir nachweisen, dass sowohl für Asthmatiker als auch Gesunde jahreszeitliche Schwankungen der Serumzytokine mittels Cosinor Model nachweisbar sind. Bei einem n von 103 gesunden Probanden ergibt sich bei der Untersuchung mittels Cosinor Model allerdings ein durchschnittliches n von unter 10 pro Monat, so dass für die weiteren statistischen Analysen ausschließlich die Saisonalitätsanalysen der gesamten Subpopulation herangezogen wurden. Die geringe Anzahl an gesunden Probanden stellt zudem eine wesentliche Limitation hinsichtlich der Aussagekraft unserer Ergebnisse der Analyse saisonaler Schwankungen ausschließlich von Gesunden dar. Eine zukünftige Analyse saisonaler Schwankungen getrennt für Asthmatiker/Wheezer und gesunde Probanden mit einer größeren Probandenanzahl scheint jedoch erstrebenswert. So fanden wir in unseren Untersuchungen unter anderem Hinweise auf gegenläufige saisonale Verläufe (Interleukin 8) als auch gegensätzliche Ergebnisse für Saisonalität (IL 1ra, IL 7, G-CSF, MIP 1 α , PDGF-bb und MIP 1 β) von Zytokinkonzentrationen im Serum zwischen Gesunden und Asthmatikern.

Im Rahmen einer Untersuchung auf Unterschiede in inflammatorischen Chemokinen bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1 als auch ihren gesunden Geschwistern konnte die Arbeitsgruppe um Thorsen S. 2014 bereits saisonale Effekte von CCL2, CCL3, CCL4 und CXCL8 aufzeigen. So zeigten sich erhöhte Konzentrationen in den Sommermonaten Juni bis August. Ebenso konnte eine

signifikante inverse Korrelation zwischen dem Alter und CCL4 Konzentrationen nachgewiesen werden [64]. Auch wir konnten eine saisonale Schwankung von MIP-1 β (CCL4) zeigen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in unseren Daten jedoch keine saisonale Variabilität für IL-8 (CXCL8) unter Betrachtung der gesamten Subpopulation. Eine separate Analyse von Asthmatikern/Wheezern sowie Gesunden zeigte jedoch ebenfalls saisonale Schwankungen. Auf die Untersuchung von Alterseffekten war unsere Studie nicht ausgelegt. So ist in unserer Studienpopulation u.a. keine gleichmäßige Verteilung der Probanden über die Altersklassen gegeben. Auch wurden wie oben angeführt die Daten des pädiatrischen und erwachsenen Studienarms bei guter Übereinstimmung der Messdaten für die Analysen zusammengeführt. Nichtsdestotrotz erfolgte im Rahmen der Analysen der Daten mittels U-Test eine Korrektur der Daten für das Alter als möglichen Einflussfaktors.

Die saisonale Variabilität von MIP-1 β konnte in Übereinstimmung mit unseren Daten durch Spath et al. gezeigt werden. Ebenfalls im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte zusätzlich eine saisonale Variabilität für TNF- α aufgezeigt werden. Nicht kongruent zu unseren Ergebnissen war eine Saisonalität für Eotaxin, IL-8, G-CSF, MIP-1 α und PDGF-bb. Spath und Kollegen haben in ihrer Arbeit die Zytokine von n=32 Patienten mit chronisch venöser Insuffizienz (CVI) untersucht, um eine mögliche Erklärung für die vermehrten Beschwerden bei CVI im Frühjahr und Sommer zu finden. Hierfür wurden die Zytokinkonzentrationen einer „Herbst-Gruppe“ (n=17; Oktober bis Dezember) und einer „Frühjahrs-Gruppe“ (n=15; April bis Juni) miteinander verglichen [65]. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen unserer Kohorte und Patienten mit CVI mögen u.a. auf die relativ niedrige Patientenzahl als auch die verschiedenen Grunderkrankungen zurückzuführen sein. Zusätzlich wurden in der Studie von Spath et al. ausschließlich zwei der vier Jahreszeiten mittels t-test miteinander verglichen. Eine Untersuchung auf monatliche Schwankungen der Zytokinkonzentrationen ist hier nicht erfolgt.

Auch Ter Horst et al. haben in ihrer Arbeit den Einfluss von Saisonalität auf Entzündungsreaktionen und Zytokine untersucht. Dabei wiesen sie kongruent zu unseren Ergebnissen einen saisonalen Effekt für TNF- α als auch IL-1 β nach. Zudem zeigte sich auch hier das Alter als ein entscheidender Einflussfaktor. Untersucht wurden die Daten von n=534 gesunden Probanden [66].

Es ist anzunehmen, dass der saisonalen Variabilität von Zytokinkonzentrationen mehrere Einflussfaktoren zu Grunde liegen. So zeigte bereits die Arbeitsgruppe um

Ulmer et al 1996, dass in Patienten mit allergischer Sensibilisierung saisonale Effekte durch erhöhte Pollenexposition verursacht sein können. Hierbei zeigten sich saisonale Verläufe des Eosinophil-Cationischem Protein (ECP) mit erhöhten Messwerten bei sensibilisierten Kindern während der Pollensaison im Vergleich zu gesunden Kindern [67]. Da das ECP mit einer erhöhten Eosinophilenzahl einhergeht und die Differenzierung sowie Aktivierung von Eosinophilen im Zusammenhang mit Interleukin 5 und 13 stehen, lassen die Ergebnisse von Ulmer et al. Indirekt auch einen Effekt einer erhöhten Pollenexposition auf die Zytokinkonzentrationen vermuten.

Eggo et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen viralen respiratorischen Infekten und der Anzahl an Asthmaexazerbationen. So konnte man im Kindes- und Jugendlichenalter ein „back to school“ Asthma mit erhöhten Exazerbationsraten nach Rückkehr zur Schule nachweisen, während sich bei Erwachsenen vor allem in den Wintermonaten im Zusammenhang mit dem Influenza-Virus erhöhte Hospitalisationsraten zeigten [68]. Da Virusinfekte einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung bei Asthmatikern nehmen, ist ein saisonaler Einfluss respiratorischer viraler Infektionen wahrscheinlich [69].

In der ALLIANCE Kohorte führte eine Temperatur von über 38,5°C in den letzten 2 Wochen oder eine eindeutige Symptomatik zu einer Verschiebung des Studientermins, um den Einfluss von Virusinfektionen zu minimieren. Ein Bias durch Virusinfektionen ist demnach in unserer Kohorte weniger wahrscheinlich.

Ein weiterer saisonaler Einflussfaktor ist die variable Sonnenexposition über das Jahr und die damit einhergehenden Schwankungen der Vitamin D Konzentrationen im Körper. Vitamin D wirkt antiinflammatorisch, indem es in die T-Zell Proliferation und Differenzierung eingreift und die Zytokinproduktion moduliert [70], [71]. So konnten z.B. Khoo et al. einen erniedrigten Anteil von IL-2 und IL-17 produzierenden CD4+T-Zellen im Sommer nachweisen [72]. Batmaz et al. haben in einer kleinen Gruppe von 30 Asthmatikern einen saisonalen Zusammenhang von Vitamin D Konzentrationen und dem Asthmakontrollstatus, der Lungenfunktion (FEV1) sowie Zytokinkonzentrationen zeigen können. Hierbei zeigten sich verbesserte FEV1 Werte und eine gebesserte Asthmakontrolle (ACT) sowie niedrigere Serumkonzentrationen von Th2 Zytokinen wie Interleukin 4 in den Sommermonaten [71].

Ein Einfluss saisonaler Effekte auf Zytokinkonzentrationen ist also mehr als wahrscheinlich und wie oben angeführt bereits in zahlreichen Arbeiten aufgezeigt

worden. Auch wir haben Saisonalität in Zytokinkonzentrationen bei Kindern und Erwachsenen mit Asthma bronchiale sowie gesunden Kontrollen nachweisen können.

Für weiterführende Untersuchungen und für eine exakte Zuordnung von Asthmatikern zu unterschiedlichen Phänotypen bzw. Endotypen ist entscheidend, ob die Saisonalität einen Einfluss auf die Diskriminierung von Asthmatikern und Gesunden hat. Hierfür haben wir in einem zweiten Schritt mittels U-Test untersucht, in wie weit sich Asthmatiker/Wheezler und gesunde Kontrollen im Hinblick auf die Konzentration der Serumzytokine unterscheiden.

Bei Wheezern waren die Serumzytokinkonzentrationen von IL-4, IL-9 und IL-17A signifikant niedriger und bei Asthmatikern die Zytokinkonzentrationen von IL-13, IL-1ra, PDGF-bb und IL-7 signifikant höher als bei gesunden Kontrollen. Von den Zytokinen mit Gruppenunterschieden im U-Test zeigten IL-4, IL-9, IL-17A, IL-1ra und TNF- α eine Saisonalität. In einem dritten Schritt wurden nun die Gruppenunterschiede für Saisonalität kontrolliert. Hierbei zeigte sich je nach Zytokin ein unterschiedlicher Einfluss auf die Gruppenunterschiede. So konnte für Interleukin 4, welches v.a. für die Differenzierung und die Expression von Immunglobulin E von Bedeutung ist und ein Schlüsselzytokin der Asthma-pathogenese darstellt, der ursprünglich ermittelte Gruppenunterschied nach Anpassung an Saisonalität nicht mehr nachgewiesen werden. Erst nach Anpassung an Saisonalität konnten für TNF- α , ein Th1-Zytokin, signifikant niedrigere Serumkonzentrationen bei Wheezern/Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufgezeigt werden. Für Interleukin 17A wiederum zeigte sich kein Einfluss der Saisonalität auf die gefundenen Gruppenunterschiede.

Unsere Arbeit hat damit den Nachweis erbracht, dass nicht nur saisonale Schwankungen in Zytokinkonzentrationen bestehen, sondern dass diese Effekte für spezifische Zytokine einen wesentlichen Einfluss auf mögliche Gruppenunterschiede darstellen. Daher ist es für zukünftige Arbeiten wichtig, Saisonalität als Korrekturfaktor bei Analysen von Gruppenunterschieden anhand von Serumzytokinen zu berücksichtigen. Hierfür sollten idealerweise die Daten jedweder Kohortenstudien jeweils neu auf Saisonalität hin getestet und anschließend dafür kontrolliert werden.

Die ALLIANCE Studie ist eine in ihrem Ablauf hochstandardisierte Kohortenstudie, die durch zahlreiche Qualitätskontrollen gekennzeichnet ist. Dies wird durch einheitliche Leitlinien und SOPs sowie regelmäßige Kontrollen der klinischen und laboratorischen Arbeit, Zentrumsbesuche und Teammeetings sichergestellt. Auch ist es eine unserer Stärken, dass Daten sowohl zu Kindern als auch Erwachsenen über eine weite Altersspannweite hinweg gesammelt werden konnten. Die Messung der Zytokine im Serum erfolgte zentral an einem Ort. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Zytokine mit einem Anteil von über 20% über- bzw. unterhalb der Nachweisgrenzen wurden für die weiteren Analysen saisonaler Effekte ausgeschlossen. Somit wurde bereits vor der Analyse der Zytokinkonzentrationen auf Saisonalität auf ein hohes Maß an Qualität der Messwerte geachtet. Zusätzlich konnte in unserer Arbeit der Einfluss saisonaler Effekte auf Serumzytokinkonzentrationen in zwei voneinander unabhängigen statistischen Verfahren belegt werden.

Eine Limitation unserer Studie ist, dass die Ergebnisse ausschließlich für Zytokinbestimmungen im Serum gelten. Es ist jedoch anzunehmen, dass Zytokine auch in anderen Biomaterialien wie z.B. einer nasalen oder bronchialen Lavage saisonalen Effekten unterliegen. Die Ergebnisse unserer Studie können jedoch sicher nicht 1:1 auf andere Biomaterialien übertragen werden. Es ist daher empfehlenswert, einen möglichen Einfluss saisonaler Effekte grundsätzlich in Studien zu bedenken, auf diese zu testen und ggf. dafür zu adjustieren.

Ogleich unsere Studienpopulation mit einem n von 514 analysierten Serumproben eine vergleichsweise große Kohorte darstellt, hat die Unterteilung in die verschiedenen Altersklassen und das Analysieren der Daten über das Jahr verteilt die Anzahl der vorhandenen Messwerte pro Monat deutlich reduziert. Auch war die Verteilung der analysierten Proben über die einzelnen Monate ungleichmäßig. Beide Punkte limitieren die Aussagekraft unsere Daten. Weitere Studien sollten folgen, um die Reproduzierbarkeit unsere Ergebnisse anhand von größeren Fallzahlen zu überprüfen.

Die Zytokinkonzentrationen im Serum von Asthmatikern/Wheezern und gesunden Kontrollen können wie bereits oben angeführt zusätzlich von äußeren Faktoren beeinflusst werden. Hierzu gehören unter anderem der aktuelle Asthmakontrollstatus, die aktuelle Asthmamedikation oder der Atopiestatus. Diese Informationen wurden in unserer Studie mittels eines Fragebogens erfasst. Eine Korrektur der Daten für alle diese Einflussfaktoren hätte jedoch die Problematik

multipler Testungen nach sich gezogen und zu Subpopulationen mit zu geringer Anzahl an untersuchten Proben geführt. Eine Untersuchung u.a. getrennt für Atopiker und nicht-Atopiker sowie steroidnaive und nicht-steroidnaive Patienten sollte mit einer größeren Fallzahl jedoch zukünftig angestrebt werden.

Der Einfluss des Zeitpunktes der Probenentnahme auf Biomarker scheint darüber hinaus nicht nur jahreszeitlich sondern auch tageszeitlich zu bestehen. So konnten Mattes et al Hinweise auf einen zirkadianen Rhythmus inflammatorischer Marker wie dem exhalatorischen Stickstoffmonoxid (FeNO) und dem eosinophilen Protein X im Urin finden. Dabei zeigte sich ein Minimum in den Abend- sowie ein Maximum in den Morgenstunden [73]. Die Rekrutierung von Patienten in Kohortenstudien zu gleichen Tageszeitpunkten stellt eine große logistische Herausforderung dar und gestaltet sich in der praktischen Umsetzung meist schwierig. In unserer Kohorte wurden die Probanden überwiegend am Nachmittag und Abend gesehen. Daher ist der eventuelle Einfluss einer zirkadianen Rhythmik in unserer Kohorte eher als gering anzusehen.

Zusammenfassend können wir festhalten, dass saisonale Schwankungen in Zytokinkonzentrationen existieren und dass das Cosinor Model ein sensitives Instrument zur Objektivierung dieser Schwankungen darstellt. In unseren Untersuchungen zeigte sich zudem, dass die Korrektur der Messwerte für Saisonalität einen Einfluss auf die Untersuchung von Gruppenunterschieden hatte. Dies konnte u.a. für zwei Schlüsselzytokine des Asthma bronchiale, Interleukin 4 und TNF- α aufgezeigt werden. Der Gruppenunterschied bei Interleukin 4 ist nach Anpassung an Saisonalität nicht mehr nachweisbar während er bei TNF- α erst nach erfolgter Korrektur für Saisonalität nachweisbar ist.

In Anbetracht der Tatsache, dass im Rahmen personalisierter Therapieansätze vermehrt monoklonale Antikörper zum Einsatz kommen und dass bei der Therapieentscheidung Asthmaendotypen eine immer größere Rolle spielen, kommt der Berücksichtigung der Saisonalität von Biomarkern eine wichtige Bedeutung zu. Die Ermittlung geeigneter statistischer Verfahren zur Anpassung von Daten an Saisonalität in Kohortenstudien mit Rekrutierung von Patienten verteilt über das Jahr, ist demnach essentiell.

5. Zusammenfassung

Nach unserem aktuellen Verständnis ist Asthma ein „Syndrom“, bestehend aus einer Vielzahl von Phänotypen und Endotypen. Die Differenzierung von Patientengruppen anhand von Biomarkern wie z.B. Zytokinen bietet neue Ansatzpunkte für personalisierte Therapieansätze. In Kohortenstudien werden Patienten über das ganze Jahr verteilt rekrutiert. Saisonale Effekte stellen hierbei einen möglichen Bias dar. Bis heute gibt es jedoch keine Studiendaten zu saisonalen Schwankungen in Zytokinkonzentrationen bei Asthmatischer und Gesunden. Ausgangshypothese dieser Arbeit war es, dass Zytokine jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Hierfür haben wir die Daten unserer ALLIANCE-Kohorte auf saisonale Schwankungen von Serumzytokinen hin untersucht. Ziel war es, für jedes untersuchte Zytokin beantworten zu können, ob saisonale Effekte existieren, sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen Asthmatischer und Gesunden finden lassen und ob die saisonalen Effekte einen Einfluss auf die Gruppenunterschiede haben.

Insgesamt wurden die Daten von 514 Asthmatischer und gesunden Kontrollen untersucht. 25 µl Serum wurden zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels Multiplex-Bead Array verwendet. Zur Erreichung einer Normalverteilung wurden die Daten boxcox-transformiert. Die Ermittlung etwaiger saisonaler Schwankungen in den Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels Cosinor Model und die Testung auf Gruppenunterschiede mithilfe des Mann-Whitney U-Tests.

Eine Saisonalität konnte für die Zytokine IL-4/1β/9/17A/1ra, TNF-α und MIP-1β (Signifikanzniveau von 0.025) nachgewiesen werden. Gruppenunterschiede zwischen Asthmatischer und Gesunden waren für IL-4/9/13/17A/1ra/7 und PDGF-bb zu finden. Die Anpassung der Zytokinkonzentrationen an Saisonalität führte zu einer Beeinflussung der gefundenen Gruppenunterschiede. So war der Gruppenunterschied bei IL-4 nach Anpassung an Saisonalität nicht mehr nachweisbar während er bei TNF- α erst nach erfolgter Korrektur vorhanden war.

Insgesamt konnten wir mit unserer Arbeit zeigen, dass spezifische Serumzytokine saisonalen Schwankungen unterliegen und diese einen Einfluss auf die Interpretation von Gruppenunterschieden zwischen Asthmatischer und Gesunden nehmen. In Kohortenstudien sollte daher generell auf Saisonalität getestet und anschließend diese bei der Analyse von Gruppenunterschieden berücksichtigt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators, „Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015,“ *Lancet*, pp. 743-800, 2015.
- [2] Global Initiative for Asthma (GINA), „GINA Report. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018,“ 2018. [Online]. Available: www.ginasthma.org. [Zugriff am 21 Februar 2018].
- [3] M. Masoli, D. Fabian, S. Holt und R. Beasley, „The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report,“ *Allergy*, pp. 469-478, 2004.
- [4] C. K. Lai, R. Beasley, J. Crane, S. Foliaki, J. Shah und S. Weiland, „Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC),“ *Thorax*, pp. 476-483, 2009.
- [5] Bundesärztekammer; Kassenärztliche Bundesvereinigung; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, „Nationale Versorgungsleitlinie Asthma - Langfassung, 3. Auflage. Version 1,“ 2018. [Online]. Available: <https://www.leitlinien.de/nvl/asthma>. [Zugriff am 10 November 2018].
- [6] National Heart, Lung and Blood Institute, „Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma (EPR-3),“ 2007. [Online]. Available: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/guidelines-for-diagnosis-management-of-asthma>. [Zugriff am 10 März 2018].
- [7] H. K. Reddel, D. R. Taylor, E. D. Bateman, L.-P. Boulet, H. A. Boushey, W. W. Busse, T. B. Casale, P. Chanaz, P. L. Enright, P. G. Gibson, J. C. de Jongste, H. Kerstjens, S. Lazarus, M. Levy, P. O'Byrne, M. Partridge, I. Pavord, M. Sears, P. Sterk, S. Stoloff, S. Sullivan, S. Szefler, M. Thomas und S. E. Wenzel, „An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations,“ *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 59-99, 2009.
- [8] S. Braman, „The Global Burden of Asthma,“ *Chest*, pp. 4-12, 2006.
- [9] K. Bahadori, M. Doyle-Waters, C. Marra, L. Lynd, K. Alasaly, J. Swiston und J. M. FitzGerald, „Economic burden of asthma: a systematic review,“ *BMC Pulm Med*, 2009.
- [10] G. J. Gibson, R. Loddenkemper, Y. Sibille, B. Lundbäck und M. Fletcher, Lung health in Europe: Facts & Figures. A better understanding of lung disease and respiratory care in Europe, UK: Charlesworth Press, 2013.
- [11] S. E. Wenzel, „Asthma: defining of the persistent adult phenotypes,“ *Lancet*, pp. 804-811, 2006.
- [12] F. Martinez und D. Vercelli, „Asthma,“ *Lancet*, pp. 1360-1372, 2013.
- [13] O. Fuchs, T. Bahmer, M. Weckmann, A.-M. Dittrich, B. Schaub, B. Rösler, C. Happle, F. Brinkmann, I. Ricklefs, I. König, H. Watz, K. Rabe, M. Kopp, G. Hansen, E. von Mutius und ALLIANCE Study Group, „The All Age Asthma

- Cohort (ALLIANCE) - From Early Beginnings to Chronic Disease: a longitudinal cohort study," *BMC Pulm Med*, pp. 1-13, 2018.
- [14] F. D. Martinez, A. L. Wright, L. M. Taussig, C. J. Holberg, M. Halonen und W. J. Morgan, „Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates," *N Engl J Med*, pp. 133-138, 1995.
- [15] O. Fuchs, T. Bahmer, K. Rabe und E. von Mutius, „Asthma transition from childhood into adulthood," *Lancet Respir Med*, pp. 224-234, 2017.
- [16] D. P. Strachan, B. K. Butland und H. R. Anderson, „Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort.," *BMJ*, pp. 1195-1199, 1996.
- [17] L. Borish, „The Immunology of Asthma: Asthma Phenotypes and Their Implications for Personalized Treatment," *Ann Allergy Asthma Immunol*, pp. 108-114, 2016.
- [18] J. Charriot, I. Vachier, L. Halimi, A.-S. Gamez, C. Boissin, M. Salama, A. Cucu-Jarjour, E. Ahmed und A. Bourdin, „Future treatment for asthma," *Eur Respir Rev*, pp. 77-92, 2016.
- [19] L. Guilleminault, H. Ouksef, C. Belleguic, Y. Le Guen, P. Germaud, E. Desfleurs, C. Leroyer und A. Magnan, „Personalised medicine in asthma: from curative to preventive medicine," *Eur Respir Rev*, pp. 1-14, 2017.
- [20] A. M. Fitzpatrick, D. J. Jackson, D. T. Mauger, S. J. Boehmer, W. Phipatanakul, W. J. Sheehan, J. N. Moy, I. M. Paul, L. B. Bacharier, M. D. Cabana, R. Covar, F. Holguin und R. F. Lemanske Jr., „Individualized Therapy for Persistent Asthma in Young Children," *J Allergy Clin Immunol*, pp. 1608-1618, 2016.
- [21] S. E. Wenzel, „Emergence of Biomolecular Pathways to Define Novel Asthma Phenotypes," *Am J Respir Cell Mol Biol*, pp. 1-4, 2016.
- [22] A. Bush, „Pathophysiological Mechanisms of Asthma," *Front Pediatr*, 2019.
- [23] I. Agache, C. Akdis, M. Jutel und J. C. Virchow, „Untangling asthma phenotypes and endotypes," *Allergy*, pp. 835-844, 2012.
- [24] G. Anderson, „Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease.," *Lancet*, pp. 1107-1119, 2008.
- [25] J. Lötvall, C. A. Akdis, L. B. Bacharier, L. Bjermer, T. B. Casale, A. Custovic, R. F. Lemanske, A. J. Wardlaw, S. E. Wenzel und P. A. Greenberger, „Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within asthma syndrome.," *J Allergy Clin Immunol*, pp. 355-360, 2011.
- [26] J. D. Zhang, E. Küng, F. Boess, U. Certa und M. Ebeling, „Pathway reporter genes define molecular phenotypes of human cells," *BMC Genomics*, pp. 1-10, 2015.
- [27] M. Amaral und W. Balch, „Hallmarks of Therapeutic Management of the Cystic Fibrosis Functional Landscape," *J Cyst Fibros*, pp. 687-699, 2015.
- [28] I. König, O. Fuchs, G. Hansen, E. von Mutius und M. V. Kopp, „What is precision medicine?," *Eur Respir J*, pp. 1-12, 2017.
- [29] C. Walker, E. Bode, L. Boer, T. T. Hansel, K. Blaser und J. C. Virchow Jr., „Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage," *Am Rev Respir Dis*, pp. 109-115, 1992.

- [30] D. Robinson, Q. Hamid, A. Bentley, S. Ying, A. B. Kay und S. R. Durham, „Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma,“ *J Allergy Clin Immunol*, pp. 313-324, 1993.
- [31] P. G. Woodruff, B. Modrek, D. F. Choy, G. Jia, A. R. Abbas, A. Ellwanger, J. R. Arron, L. L. Koth und J. V. Fahy, „T-helper Type 2-driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma,“ *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 388-395, 2009.
- [32] J. T. Olin und M. E. Wechsler, „Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment,“ *BMJ*, pp. 1-11, 2014.
- [33] D. J. Erle und D. Sheppard, „The cell biology of asthma,“ *J Cell Biol*, pp. 621-631, 2014.
- [34] L. S. van Rijt, S. Jung, A. KleinJan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. C. Hoogsteden und B. N. Lambrecht, „In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma,“ *J Exp Med*, pp. 981-991, 2005.
- [35] L. Liu, B. E. Rich, J. Inobe, W. Chen und H. L. Weiner, „Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4,“ *Int Immunol*, pp. 1017-1026, 1998.
- [36] S. L. Swain, A. D. Weinberg, M. English und G. Huston, „IL-4 directs the development of Th-like helper effectors,“ *J Immunol*, pp. 3796-3806, 1990.
- [37] M. Jutel und C. A. Akdis, „T-cell Subset Regulation in Atopy,“ *Curr Allergy Asthma Rep*, pp. 139-145, 2011.
- [38] R. M. Locksley, „Asthma and Allergic Inflammation,“ *Cell*, pp. 777-783, 2010.
- [39] J. Bernink, J. Mjösberg und H. Spits, „Th1- and Th2-like subsets of innate lymphoid cells,“ *Immunol Rev*, pp. 133-138, 2013.
- [40] R. G. Klein Wolterink, A. Kleinjan, M. van Nimwegen, I. Bergen, M. de Bruijn, Y. Levani und R. W. Hendriks, „Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma.,“ *Eur J Immunol*, pp. 1106-1116, 2012.
- [41] C. Walker, J.-C. Virchow, P. L. Buijnzeel und K. Blaser, „T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma,“ *J Immunol*, pp. 1829-1835, 1991.
- [42] H. Y. Kim, R. H. DeKruyff und D. T. Umetsu, „The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity,“ *Nat Immunol*, pp. 577-584, 2010.
- [43] E. Mendez-Enriquez und J. Hallgren, „Mast cells and their progenitors in allergic asthma,“ *Front. Immunol.*, 2019.
- [44] B. Samuelsson, „Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation,“ *Science*, pp. 568-575, 1983.
- [45] N. A. Barrett und K. F. Austen, „Innate Immunity in Th2-type Airway Inflammation,“ *Immunity*, pp. 425-437, 2009.
- [46] D. H. Pols, J. B. Wartna, E. I. van Alphen, H. Moed, N. Rasenberg, P. J. Bindels und A. M. Bohnen, „Interrelationships between Atopic Disorders in Children: A Meta-Analysis Based on ISAAC Questionnaires.,“ *PLoS One*, pp. 1-15, 2 Juli 2015.

- [47] M. Humbert, G. Menz, S. Ying, C. J. Corrigan, D. S. Robinson, S. R. Durham und A. B. Kay, „The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences,“ *Immunol Today*, pp. 528-533, 1999.
- [48] M. Humbert, G. Menz, S. Ying, C. J. Corrigan, D. S. Robinson, S. R. Durham und A. B. Kay, „The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences,“ *Immunol Today*, pp. 528-533, 1999.
- [49] G. Turato, A. Barbato, S. Baraldo, M. E. Zanin, E. Bazzan, K. Lokar-Oliani, F. Calabrese, C. Panizzolo, D. Snijders, P. Maestrelli, R. Zuin, L. M. Fabbri und M. Saetta, „Nonatopic Children with Multitrigger Wheezing Have Airway Pathology Comparable to Atopic Asthma,“ *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 476-482, 2008.
- [50] E. Y. Kim, J. T. Battaile, A. C. Patel, Y. You, E. Agapov, M. H. Grayson, L. A. Benoit, D. E. Byers, Y. Alevy, J. Tucker, S. Swanson, R. Tidwell, J. W. Tyner, J. D. Morton, M. Castro, D. Polineni, G. A. Patterson, R. A. Schwendener, J. D. Allard, G. Peltz und M. J. Holtzmann, „Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease,“ *Nat Med*, pp. 633-640, 2008.
- [51] L. S. Subrata, J. Bizzintino, E. Mamessier, A. Bosco, K. L. McKenna, M. E. Wikström, J. Goldblatt, P. D. Sly, B. J. Hales, W. R. Thomas, I. A. Laing, P. N. LeSouef und P. G. Holt, „Interactions between innate antiviral and atopic immunoinflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in children,“ *J Immunol*, pp. 2793-2800, 2009.
- [52] R. H. DeKruyff, S. Yu, H. Y. Kim und D. T. Umetsu, „Innate immunity in the lung regulates the development of asthma,“ *Immunol Rev*, pp. 235-248, 2014.
- [53] S. E. Wenzel, „Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches,“ *Nat Med*, pp. 716-725, 2012.
- [54] A. M. Nanzer und A. Menzies-Gow, „Defining severe asthma - an approach to find new therapies,“ *Eur Clin Respir J*, 2014.
- [55] M. Soler, J. Matz, R. Townley, R. Buhl, J. O'Brien, H. Fox, J. Thirlwell, N. Gupta und G. Della Cioppa, „The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics,“ *Eur Respir J*, pp. 254-261, 2001.
- [56] W. Busse, J. Corren, B. Q. Lanier, M. McAlary, A. Fowler-Taylor, G. D. Cioppa, A. van As und N. Gupta, „Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma,“ *J Allergy Clin Immunol*, pp. 184-190, 2001.
- [57] H. Milgrom, W. Berger, A. Nayak, N. Gupta, S. Pollard, M. McAlary, A. F. Taylor und P. Rohane, „Treatment of childhood asthma with anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab),“ *Pediatrics*, pp. 1-10, 2001.
- [58] N. A. Hanania, S. Wenzel, K. Rosen, H. J. Hsieh, S. Mosesova, D. F. Choy, P. Lal, J. R. Arron, J. M. Harris und W. Busse, „Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study,“ *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 804-811, 2013.
- [59] M. Castro, J. Corren, I. D. Pavord, J. Maspero, S. Wenzel, K. F. Rabe, W. W. Busse, L. Ford, L. Sher, J. M. FitzGeraöd, C. Katelaris, Y. Tohda, B. Zhang, H. Staudinger, G. Pirozzi, N. Amin, M. Ruddy, B. Akinlade, A. Khan, J. Chao, R. Martincova, N. M. Graham, J. D. Hamilton, B. N. Swanson, N. Stahl, G. D.

- Yancopoulos und A. Teper, „Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma,“ *N Engl J Med*, pp. 2486-2496, 2018.
- [60] K. Rabe, N. Parameswaran, G. Brusselle, J. F. Maspero, M. Castro, L. Sher, H. Zhu, J. D. Hamilton, B. N. Swanson, A. Khan, J. Chao, H. Staudinger, G. Pirozzi, C. Antoni, N. Amin, M. Ruddy, B. Akinlade, N. M. Graham, N. Stahl, G. D. Yancopoulos und A. Teper, „Efficacy and Safety of Dupilumab in Glucocorticoid-Dependent Severe Asthma,“ *N Engl J Med*, pp. 2475-2485, 2018.
- [61] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*, 4. Auflage Hrsg., Thieme, 2016.
- [62] K. Brown, R. Krouse, A. Calatroni, C. Visness, U. Sivaprasad, C. Kerckmar, E. Matsui, J. West, M. Makhija, M. Gill, H. Kim, M. Kattan, D. Pillai, J. Gern, W. Busse, A. Togias, A. Liu und G. Khurana Hershey, „Endotypes of difficult-to-treat asthma in inner-city african american children,“ *PLOS ONE*, pp. 1-16, 2017.
- [63] A. G. Barnett und A. J. Dobson, *Analysing Seasonal Health Data*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.
- [64] S. Thorsen, S. Eising, H. Mortensen, K. Skogstrand, F. Pociot, J. Johannesen und J. Svensson, „Systemic Levels of CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL8 Differ According to Age, Time Period and Season among Children Newly Diagnosed with type 1 Diabetes and their Healthy Siblings,“ *Hum Immunol*, pp. 452-461, 2014.
- [65] P. Spath, V. Tisato, S. Giancesini, M. Tessari, E. Menegatti, R. Manfredini, S. Occhionorelli, P. Secchiero und P. Zamboni, „The calendar of cytokines: Seasonal variation of circulating cytokines in chronic venous insufficiency,“ *JRSM Cardiovasc Dis*, pp. 1-8, 2017.
- [66] R. ter Horst, M. Jaeger, S. Smekens, R. Notebaart, L. Joosten und M. Netea, „Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses,“ *Cell*, pp. 1111-1124, 2016.
- [67] C. Ulmer, M. Kopp, G. Ihorst, M. Moseler, J. Forster und J. Kühr, „Allergische Entzündung der Nasen-Schleimhaut bei pollensensibilisierten Kindern während natürlicher Pollen-Exposition,“ *Sozialpädiatrie und Kinderärztliche Praxis*, pp. 104-110, 1996.
- [68] R. Eggo, J. Scott, A. Galvani und L. A. Meyers, „Respiratory virus transmission dynamics determine timing of asthma exacerbation peaks: Evidence from a population-level model,“ *PNAS*, pp. 2194-2199, 2016.
- [69] R. Kumar, P. Foster und H. Rosenberg, „Respiratory viral infection, epithelial cytokines, and innate lymphoid cells in asthma exacerbations,“ *J Leukoc Biol*, pp. 391-396, 2014.
- [70] E. Calton, K. Keane, R. Raizel, J. Rowlands, M. Soares und P. Newsholme, „Winter to summer change in vitamin D status reduces systemic inflammation and bioenergetic activity of human peripheral blood mononuclear cells,“ *Redox Biol*, pp. 814-820, 2017.
- [71] S. B. Batmaz, T. Arikoglu, L. Tamer, G. Eskandari und S. Kuyucu, „Seasonal variation of asthma control, lung function tests and allergic inflammation in relation to vitamin D levels: a prospective annual study,“ *Postepy Dermatol Allergol*, pp. 99-105, 2018.
- [72] A.-L. Khoo, H. Koenen, L. Chai, F. Sweep, M. Netea, A. van der Ven und I. Joosten, „Seasonal Variation in Vitamin D3 Levels Is Paralleled by Changes

in the Peripheral Blood Human T Cell Compartment," *PLoS ONE*, pp. 1-11, 2012.

- [73] J. Mattes, K. Storm van 's Gravesande, C. Moeller, M. Moseler, M. Brandis und J. Kuehr, „Circadian Variation of Exhaled Nitric Oxide and urinary eosinophil protein X in asthmatic and healthy children," *Pediatr Res*, pp. 190-194, 2002.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Matthias Kopp, der mich sowohl fachlich als auch persönlich über die gesamte Bearbeitungsphase meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt hat, als auch Dr. Markus Weckmann, als Stellvertretender Leiter der Sektion Pädiatrische Pneumologie und Allergologie als auch Laborleiter der KIRA Kohorte am Standort Lübeck. Beiden möchte ich herzlich danken für ihre unermüdliche Ausdauer beim Korrekturlesen und ihre zahlreichen konstruktiven Anregungen.

Außerdem gilt mein Dank der gesamten ALLIANCE Kohorte, den teilnehmenden Familien und Patienten sowie auch gesunden Kontrollen, als auch dem gesamten Studienteam der jeweiligen Studienzentren. Erst durch die Zusammenarbeit aller war diese Arbeit erst möglich.

Besonders möchte ich mich auch bei dem Team des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik um Frau Dr. Inke König, insbesondere Dominik Thiele, für ihre Unterstützung und Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation immer wieder motiviert haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Lebenslauf

Lena Liboschik

Persönliche Angaben

Mobil +49 173 4257439
E-Mail lena.liboschik@gmail.com

Geboren 10th Oktober 1987
Geburtsort Bad Honnef
Staatszugehörigkeit deutsch



Berufserfahrung

02/2017 – heute Assistenzärztin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin UKSH Lübeck

10/2014 – 05/2015 Dozententätigkeit als Honorarkraft, Grone Bildungszentrum für Gesundheits- und Sozialberufe GmbH

12/2010 – 01/2015 Wissenschaftliche Hilfsmitarbeiterin, Schlaflabor der Psychiatrie UKSH, Lübeck

10/2009 – 09/2010 Global Launch Team VEGF Trap-Eye, Bayer Schering Pharma AG, Berlin

Kongressbeiträge, Veröffentlichungen, Auszeichnungen

1. Liboschik L, Herz A, Kopp M: „Nicht jeder akut auftretende inspiratorische Stridor bei Kleinkindern ist eine stenosierende Laryngotracheitis“ - GPP Posterbeitrag 2016.
2. Liboschik L, Weckmann M, König I, Thiele D, Pech M, Happle C, Fuchs O, Dittrich A-M, Schaub B, Ricklefs I, Bahmer T, Rabe K, von Mutius E, Hansen G, Kopp M, and The Alliance Study Group: „Cytokine patterns in children with wheezing and asthma show specific patterns of variability over time“ - GPP Beitrag 2018.
3. Liboschik L, Weckmann M, König I, Thiele D, Pech M, Happle C, Fuchs O, Dittrich A-M, Schaub B, Ricklefs I, Bahmer T, Rabe K, von Mutius E, Hansen G, Kopp M, and The Alliance Study Group: „Unterscheiden sich die Serum-Zytokinmuster bei Kindern und Erwachsenen in Abhängigkeit von einer vorangegangenen Asthmaexazerbation?“ - GPP Posterbeitrag 2019 – Auszeichnung mit einem Posterpreis.

Klinische Studien (Teilnahme)

1. Seit 2015: Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL) – „Translationale Forschung zur Bekämpfung weitverbreiteter Lungenerkrankungen“ – KIRA-Studie: Kinder-Register-Asthma-Kohorte
2. 2017-2018: pedCAPNETZ – Beobachtungsstudie zur ambulant erworbenen Pneumonie im Kindes- und Jugendalter
3. 2017-2018: „Beobachtungsstudie zum Krankheitsverlauf bei Patienten mit Mukoviszidose nach Diagnosestellung im Neugeborenen-Screening“

Ausbildung

<i>10/2010 – 12/2016</i>	Universität zu Lübeck: Humanmedizin → Ärztliche Prüfung – 2 (gut)
<u>Praktisches Jahr:</u>	<i>11/15 – 03/16</i> UKSH Lübeck, Kinderheilkunde <i>03/16 – 06/16</i> WKK Heide, Chirurgie <i>06/16 – 10/16</i> Segebergerkliniken, Innere
<u>Famulaturen:</u>	<i>07/13 – 07/13</i> KH Rotes Kreuz Lübeck, Geriatrie <i>08/13 – 09/13</i> Hausarztpraxis Dr. med. Christine Falk <i>09/13 – 10/13</i> UKSH Lübeck, Frauenheilkunde u Geburtshilfe <i>02/14 – 03/14</i> UKSH Lübeck, Plastische Chirurgie <i>09/14 – 09/14</i> UKSH Lübeck, Kinderheilkunde
<i>10/2006 – 09/2009</i>	Berlin School of Economics: Einrichtung für duale Studiengänge, in Zusammenarbeit mit der Bayer Schering Pharma AG, Berlin Studiengang: Industrie → Bachelor of Arts (210 Credits) - Abschlussnote 1,6
<i>08/1999 – 06/2006</i>	Gymnasium: „Hermann-von-Helmholtz-Gymnasium“, Potsdam → Abitur - Abschlussnote 1,3 (sehr gut)
<i>08/1997 – 06/1999</i>	Gymnasium: „Liebfrauenschule Bonn“
<i>08/1995 – 06/1997</i>	Grundschule: „Michaelschule Bonn“

Fähigkeiten

<i>Berufliche Qualifikationen</i>	PINA Akademie (2018), Einführungskurs in die Sonographie des Abdomens und der Schilddrüse (2016), Simulationstraining Advanced Life Support (2016), Kurs zum Erwerb der Kenntnisse im Strahlenschutz für Ärzte (2013)
<i>Sprachen</i>	Deutsch (Muttersprache), Englisch (sehr gut) Französisch (gut), Spanisch (Grundkenntnisse)
<i>IT</i>	Microsoft Office (sehr gut), ORBIS (sehr gut)
<i>Weitere</i>	Training „Präsentieren und Visualisieren“, Seminar „Kommunikation & Teambuilding“
<i>Interessen</i>	Volleyball (Lübecker Turnerschaft e.V.), Joggen, Singen, Querflöte spielen, Lesen

Mitgliedschaften

Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie
Marburger Bund

Lübeck, 31. März 2019

Liboschik