

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät–Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifikation pathogenetischer Immunzellen im Blut bei  
atopischem Ekzem (Allcytome)

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
– Universitätsmedizin Berlin

von

Valerie Glatzel

aus Hannover

Datum der Promotion: 05.03.2021

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract .....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Atopische Dermatitis .....	3
1.1.1 Definition .....	3
1.1.2 Therapie.....	5
1.2 Pathomechanismen .....	6
1.2.1 Hautbarrierestörung.....	8
1.2.2 Die Rolle des Immunsystems in der AD.....	8
1.2.2.1 Eosinophile Granulozyten .....	10
1.2.2.2 NK-Zellen.....	11
1.2.2.3 Innate lymphoid cells 2 (ILC2s).....	11
1.2.2.4 T-Zellen .....	12
1.2.2.5 B-Zellen.....	14
1.3 <u>Cytometry by Time-of-Flight (CyTOF)</u> -Methode (Massenzytometrie).....	15
1.3.1 Funktionsprinzip des CyTOF-Instruments und Vergleich zur Durchflusszytometrie .....	15
2 Fragestellung und Ziel der Untersuchung.....	18
3 Patienten und Methode .....	19
3.1 Aufbau der Untersuchung.....	19
3.1.1 Fallzahl.....	21
3.2 Zellvorbereitung und Messung .....	21
3.2.1 Antikörper .....	21
3.2.2 Probenaufbereitung, Färbung und Messung.....	24
3.2.3 Vorgating und Donoridentifikation.....	27
3.3 Statistik .....	28
4 Ergebnisse.....	31
4.1 Patientencharakterisierung.....	31

4.2	CyTOF-Methode und Optimierungsstrategien .....	31
4.3	Zellanalyse .....	34
4.3.1	Eosinophile Granulozyten .....	36
4.3.2	NK-Zellen.....	37
4.3.3	Innate lymphoid cells 2 (ILC2s).....	39
4.3.4	T-Zellen.....	40
4.3.5	B-Zellen und weitere Leukozyten .....	45
5	Diskussion.....	47
5.1	Patientengut.....	47
5.2	Technische Optimierungsstrategien.....	47
5.3	Zellanalyse .....	49
5.3.1	Eosinophile Granulozyten .....	49
5.3.2	NK-Zellen.....	50
5.3.3	Innate Lymphoid Cells 2 (ILC2s) .....	53
5.3.4	T-Zellen.....	54
5.3.5	Th2-Zellen.....	56
5.3.6	Tregs.....	57
5.3.7	B-Zellen.....	58
5.4	Limitationen.....	60
5.5	Ausblicke und Ansätze für mögliche weiterführende Studien .....	61
6	Literaturverzeichnis .....	63
7	Anhang.....	69
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	69
7.2	Tabellenverzeichnis .....	69

## Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis; Syn. atopisches Ekzem
ADm	moderate atopische Dermatitis
ADs	schwere atopische Dermatitis
Basophile	Basophile Granulozyten
CD	Cluster of Differentiation
CSM	<u>c</u> ell <u>s</u> taining <u>m</u> edium (Färbemedium)
CyTOF	<u>C</u> ytometry by <u>T</u> ime- <u>o</u> f- <u>F</u> light
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin
EASI	<u>E</u> kzema <u>A</u> rea <u>S</u> everity <u>I</u> ndex
Eosinophile	Eosinophile Granulozyten
FlowSOM	Flow self-organizing-maps
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
HLADR	Human Leukocyte Antigen DR (MHC II Zelloberflächenrezeptor)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
ILCs	innate lymphoid cells
ILC2s	innate lymphoid cells Typ 2
IQR	Interquartile Range (Quartilsabstand)
MELC	<u>M</u> ultiple <u>E</u> pitope <u>L</u> igand <u>C</u> artography
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I/II
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
SCORAD	<u>S</u> coring of <u>A</u> topic <u>D</u> ermatitis
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
TARC	thymusaktivitätsregulierendes Chemokin
Tcyt	zytotoxische T-Zelle (CD8 <sup>+</sup> )
Th	T-Helferzelle (CD4 <sup>+</sup> )



Th2	Typ 2-T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

## **Zusammenfassung**

**Einleitung:** Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch rezidivierende Hauterkrankung mit hoher Prävalenz. Charakteristisch für diese Erkrankung ist neben der epidermalen Barriestörung und IgE-vermittelten Sensibilisierungen eine zellvermittelte Entzündung, welche Gegenstand dieser Untersuchung war. Hierzu wurde die hoch-dimensionale Massenzytometrie (CyTOF) als Hypothesen-generierender Ansatz zur systematischen Analyse aller Leukozytenpopulationen im peripheren Blut eingesetzt.

**Methode:** Es wurden 40 Patienten mit extrinsischer AD (Gesamt-IgE-Serumspiegel >100 kU/l, multiple Sensibilisierungen) eingeteilt in moderate AD (ADm, SCORAD 15 bis <40) und schwere AD (ADs, SCORAD  $\geq$ 40) und 20 gesunde Probanden in diese Untersuchung eingeschlossen. 35 Oberflächenantigene wurden massenzytometrisch auf jeder Einzelzelle gemessen. Basierend auf antizipierten Zielpopulationen sowie den Ergebnissen einer nicht-supervidierten Cluster-Analyse wurden Zellpopulationen manuell mit der Software FlowJo identifiziert und quantifiziert.

**Ergebnisse:** Die drei Untersuchungsgruppen waren bezüglich Alter und Geschlecht vergleichbar. Die Patientengruppen unterschieden sich im Schweregrad ( $P < 0,001$ ). Im Blut von AD-Patienten gemessene Eosinophilenfrequenzen waren im Vergleich zu Gesunden 3,8-4,3-fach höher. ADs-Patienten zeigten verglichen mit Gesunden eine geringere mediane Frequenz der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Dabei war die Frequenz von CD38- und CD69-exprimierenden NK-Zellen bei diesen Patienten höher als bei Gesunden. In der ADs-Patientengruppe waren die T-Zellfrequenzen um 27,6 % verringert ( $P = 0,034$ ) und innerhalb der T-Helferzellen wurden in beiden Patientengruppen erhöhte Frequenzen von regulatorischen T-Zellen (Tregs) im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen ( $P < 0,001$ ). Bei AD-Patienten war dabei der Anteil der aktivierten Tregs erhöht. Typ 2-Helferzellfrequenzen (Th2) waren vergleichbar.

**Schlussfolgerung:** Die erstmals erfolgte hochauflösende Analyse des gesamten Leukozytenkompartiments im Blut von AD-Patienten und Gesunden mittels der innovativen CyTOF-Technologie identifizierte bisher nicht beschriebene Zellpopulationen, wie eine NK-Zellsubpopulation mit aktiviertem Phänotyp sowie Veränderungen im T-Zellkompartiment insbesondere von aktivierten Tregs. Die vorliegenden Ergebnisse aus dem Blut und die hier etablierte CyTOF-Methode können eingesetzt werden, um auch in anderen

Gewebe oder Krankheitsmodellen krankheitsspezifische Veränderungen zu identifizieren.

## **Abstract**

**Background:** Atopic dermatitis (AD) is a relapsing chronic skin disease with a high prevalence. In addition to an epidermal barrier dysfunction and an IgE-mediated sensitization this disease is also characterized by a cell-mediated inflammation which was subject of this study. Using high dimensional mass cytometry (CyTOF) as a hypothesis-generating approach we conducted a systematic analysis of all leukocyte populations in peripheral blood.

**Method:** In this study we included 40 patients with extrinsic AD (serum-IgE-level >100 kU/l, multiple sensibilizations) grouped into moderate AD (ADm, SCORAD 15 to <40) and severe AD (ADs, SCORAD  $\geq$ 40) and 20 healthy controls. 35 immunophenotypic parameters were measured on the cell surface of single cells using mass cytometry. Cell populations were manually identified and quantified using the software FlowJo based on anticipated target populations as well as the results of a non-supervised analysis.

**Results:** The three study groups were comparable in age and gender. Patient groups differed in disease severity ( $P < 0.001$ ). Eosinophil frequencies were 3.8-4.3 times higher in the blood of AD patients than in the one of healthy donors. Median frequencies of NK cells were lower in the blood of ADs-patients compared to healthy participants. The frequency of CD38- and CD69-expressing NK cells was higher in these patients than in healthy participants. In the ADs-patient group T-cell frequencies were reduced by 27.6 % ( $P = 0.034$ ) and within T-helper cells in both patient groups higher frequencies of regulatory T-cells (Tregs) compared to the control group were measured ( $P < 0.001$ ). In AD-patients the portion of activated Tregs was increased. The type-2 helper-T-cell frequency (Th2) was comparable.

**Conclusion:** The first-ever high-resolution analysis of the entire leukocyte compartment in the blood of AD-patients and healthy donors using the innovative CyTOF-technology identified previously unreported cell populations, such as an activated NK cell subpopulation and changes in the T-cell compartment, in particular activated Tregs. The present results from blood and the CyTOF-method which has been established in this study can be used to identify disease-specific transformations also in other tissues or disease models.

# **1 Einleitung**

Die Kenntnis über den Pathomechanismus der atopischen Dermatitis (AD) ist wichtig, um die Krankheit besser zu verstehen, neue Therapieansätze zu entwickeln sowie Marker für ein verbessertes Monitoring der Krankheitsaktivität zu finden. In dieser Untersuchung wurden erstmals massenzytometrisch 35 Parameter auf Einzelzellebene im Blut von AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden gemessen und ausgewertet. Dies ermöglichte eine hoch-dimensionale Analyse von immunphänotypischen Markern zur Identifizierung krankheitsspezifischer Phänotypen im Blut.

## **1.1 Atopische Dermatitis**

### **1.1.1 Definition**

Die atopische Dermatitis (AD), auch atopisches Ekzem genannt, ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die häufig mit anderen Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie Asthma und allergischer Rhinokonjunktivitis assoziiert ist. Die AD ist charakterisiert durch eine trockene Haut, Juckreiz und Ekzeme. Sie kann deutliche Auswirkungen auf die Lebensqualität der Betroffenen haben. Pathophysiologisch werden eine epidermale Barriestörung, eine Aktivierung verschiedener T-Zellpopulationen sowie eine veränderte bakterielle Besiedelung der Haut als bedeutend diskutiert (1).

Die AD ist eine häufige Erkrankung, die besonders im Kindesalter mit einer Prävalenz von 10-15 % auftritt (2). Die Lebenszeitprävalenz von Erwachsenen liegt bei 3,5 %, die 12-Monatsprävalenz beträgt 2,2 % (3). Die Krankheit beginnt häufig in der frühen Kindheit, in 60 % der Fälle manifestiert sie sich innerhalb des 1. Lebensjahres (4). Kennzeichnend ist ein chronisch rezidivierender Verlauf. Dennoch geht sie bei bis zu 70 % der Kinder, die in den ersten zwei Lebensjahren betroffen sind, in Spontanremission (5).

Das klinische Bild verändert sich mit dem Alter: in der frühen Kindheit erscheinen erste Läsionen häufig an Wangen und an der Kopfhaut, in der späteren Kindheit sind meist die Beugen betroffen. Im Erwachsenenalter findet man lichenifizierte Plaques an Beugeseiten, Kopf, Nacken und Händen (5). Zu weiteren Faktoren, die neben dem Alter das klinische Bild beeinflussen können, gehören: Herkunft des Patienten, akuter vs. chronischer Verlauf, die therapeutische Wirksamkeit und infektiöse oder allergische bzw. irritative Trigger (6).

Die Diagnose der AD wird primär klinisch entsprechend der Kriterien von Hanifin und Rajka gestellt (s. Tabelle 1). Die Patienten haben typischerweise eine positive atopische Familienanamnese und weisen Sensibilisierungen gegen verschiedene Umweltallergene wie Pollen, Tierhaare und Hausstaubmilben auf. Bei ca. 80 % der Patienten ist die Gesamt-IgE-Konzentration im Serum erhöht. Diese Form wird extrinsische AD genannt (7). Außerdem zeigen die Patienten den oben beschriebenen alterstypischen Verlauf und Hautläsionen mit typischer Morphologie (akute Ekzeme: flächige Erytheme, Ödeme, Papeln, Papulovesikel, Nässen und Krusten; chronische Ekzeme: flächige Infiltrationen, Papeln, Lichenifikation, Schuppen).

**Tabelle 1: Diagnostische Kriterien nach Hanifin und Rajka.**

Hauptkriterien (≥ 3)	Plus Nebenkriterien (≥ 3)
Juckreiz	Trockene Haut
Typ. Morphologie und Verteilung	Positiver Prick-Test
Chronizität	Erhöhte Serum-IgE-Werte
Positive Eigen- oder Familienanamnese für Atopie (Asthma, allerg. Rhinitis, AD)	Juckreiz beim Schwitzen
	Wollunverträglichkeit
	Dennie-Morgan-Falte
	Weißer Dermographismus

Mindestens drei Haupt- und mindestens drei Nebenkriterien müssen für die Diagnose nach Hanifin & Rajka erfüllt sein (8). Die wichtigsten Nebenkriterien sind aufgeführt.

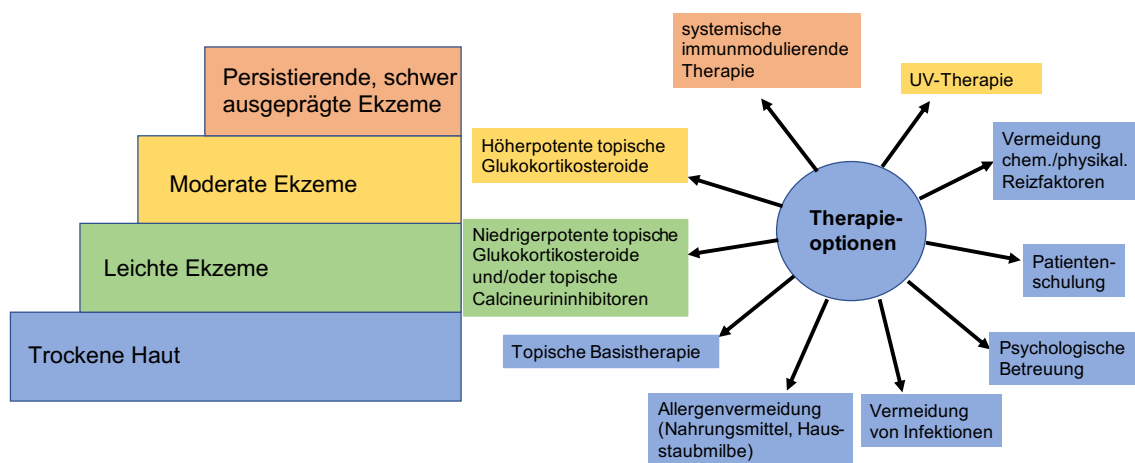
Hanifin und Rajka unterscheiden zwischen Haupt- und Nebenkriterien (8). In den Hauptkriterien werden Merkmale wie Pruritus, das typische Erscheinungsbild der AD und der chronische Verlauf sowie die positive Eigen- oder Familienanamnese für Atopie berücksichtigt. Zu den Nebenkriterien zählen u.a. trockene Haut (Xerosis cutis), positiver Prick-Test und erhöhte Serum-IgE-Werte.

Zur Einschätzung des Schweregrades ist der SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis) im ambulanten Bereich etabliert (s. Kapitel 3.1). Neben diesem kann bei AD-Patienten ebenfalls der EASI (Ekzema Area Severity Index) verwendet werden, dessen Erhebung allerdings mit erhöhtem Zeitaufwand verbunden ist. In Anlehnung an den EASI hat die Gruppe um Thijs et al. mit der Bestimmung von TARC (thymusaktivitätsreguliertes Chemokin), Interleukin (IL)-22 und dem löslichen IL-2-Rezeptor einen neuen Biomarker (p-

EASI) vorgeschlagen, der zukünftig zur objektiven Bestimmung der Krankheitsschwere verwendet werden könnte (9).

### 1.1.2 Therapie

Die Therapie der AD erfolgt entsprechend dem klinischen Schweregrad. Es stehen verschiedene medikamentöse und nicht-medikamentöse Maßnahmen zur Verfügung. Grundsätzlich geht man nach einem Stufenschema vor (s. Abbildung 1) (10; 11). Grundlage ist die topische Basistherapie zur Behandlung der trockenen Haut und der damit verbundenen Hautbarrierestörungen. Außerdem wird der Patient im Umgang mit der Erkrankung geschult und eine Vermeidung von Triggerfaktoren wie Allergenexposition oder Infektionen wird angestrebt.



**Abbildung 1: Stufentherapie bei atopischer Dermatitis.**

Entsprechend dem Schweregrad der AD werden die Patienten mit nicht-medikamentösen und medikamentösen Maßnahmen behandelt. Eine UV-Therapie kann bei ausreichender Indikation bereits bei leichten Ekzemen durchgeführt werden.

Bei leichten Ekzemen können niedrigpotente topische Glukokortikosteroide und/ oder Calcineurininhibitoren zur Therapie angewandt werden. Außerdem ist eine UV-Therapie bei ausreichender Indikationsstellung ab dieser Stufe empfohlen (11). Zur Therapieeskalation können bei moderaten Ekzemen, bei denen die Therapie der vorherigen Stufen nicht ausreicht, zusätzlich höherpotente Glukokortikosteroide zum Einsatz kommen (11). Ist ein Patient gegen o.g. Maßnahmen resistent, ist eine systemische Therapie indiziert. Hier kommen immunmodulierende Medikamente wie Ciclosporin A und systemische Glukokortikosteroide zum Einsatz, die allerdings wegen ihrer Nebenwirkungen nicht für den Langzeitgebrauch geeignet sind (12). Seit Ende 2017 ist eine biologische Therapie

mit dem Antikörper Dupilumab (IL-4-Rezeptor  $\alpha$ /IL-13-Rezeptor-Antagonist) für Patienten mit moderater bis schwerer AD zugelassen (13-15). Dupilumab greift in die Typ 2-T-Helferzell-(Th2)-Antwort (IL-4 und IL-13) ein, die eine bedeutende Rolle in der AD zu spielen scheint (s.u.).

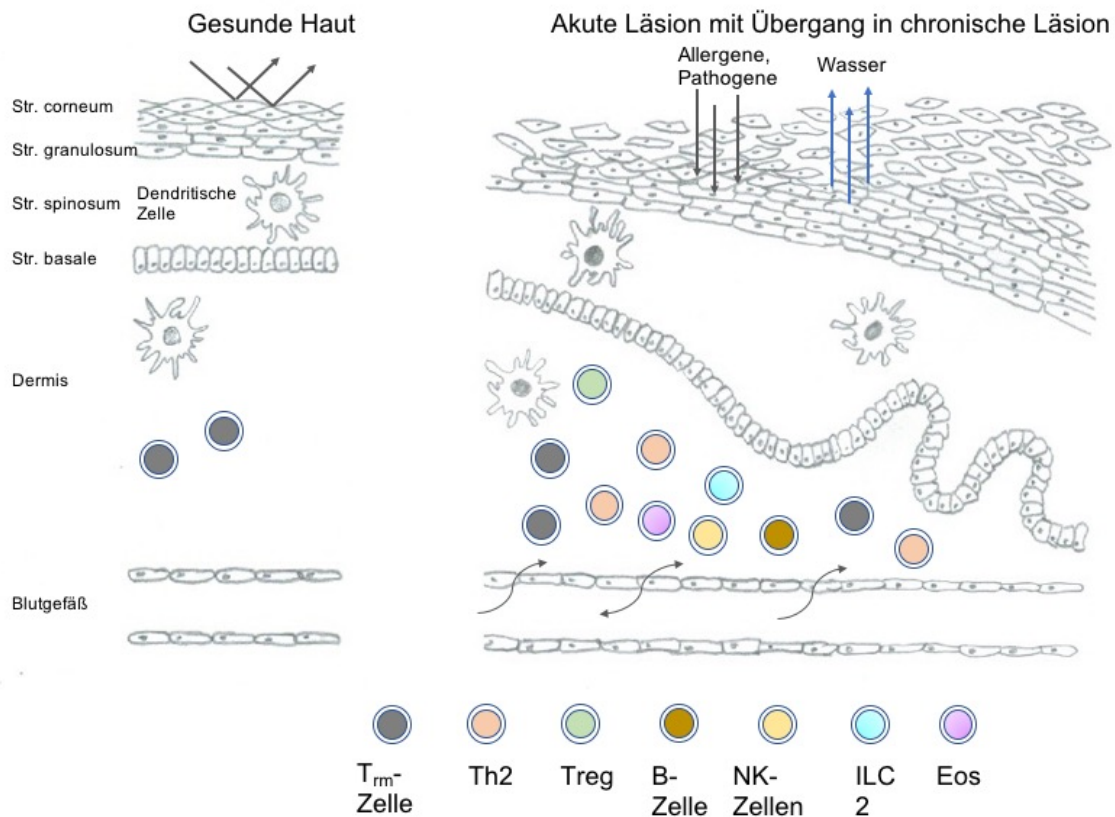
Bei Patienten mit schwerer AD kann ferner eine Therapie mit Azathioprin, Methotrexat oder Mycophenolatmofetil erwogen werden (11). Allerdings sind diese Medikamente für die AD bisher nicht zugelassen (sog. off-label-use). Für Patienten mit refraktärer AD müssen effektive Medikamente, die wenige bzw. keine Nebenwirkungen zeigen, noch gefunden werden (12).

Derzeit werden weitere monoklonale Antikörper gegen verschiedene Zielstrukturen (Janus-Kinasen (JAK), thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-5, IL-13, IL-31, Histamin-4-Rezeptor) in klinischen Studien untersucht (16; 17).

Mit den bisher verfügbaren Medikamenten für die AD kann meistens eine Kontrolle der Krankheitsaktivität erreicht werden, wobei in ausgeprägten Fällen unter der Behandlung weiterhin Symptome bestehen, die die Lebensqualität stark einschränken. Zur Entwicklung einer kausalen Therapie ist ein besseres Verständnis der pathogenetischen Mechanismen notwendig.

## **1.2 Pathomechanismen**

Die zwei bisher bekannten, wichtigsten Veränderungen in der Pathogenese der AD sind die Dysfunktion der epidermalen Barriere und die gestörte Immunantwort. Diese beiden Störungen beeinflussen sich gegenseitig und fördern dadurch die Entstehung der AD (18). Noch ist nicht geklärt, ob und welche Störung die andere bedingt. Es haben sich zwei Hypothesen zur Erklärung der Pathogenese durchgesetzt: Die eine besagt, dass die Hautbarrierestörung die systemische Inflammation triggert. Die andere geht davon aus, dass die immunologische Dysregulation eine IgE-vermittelte Sensibilisierung verursacht und die epidermale Hautbarrieredysfunktion hervorruft (19). In Abbildung 2 ist die gesunde Haut im Vergleich zur Haut eines AD-Patienten dargestellt.



**Abbildung 2: Gestörte Epithelbarriere und Immunantwort bei AD-Patienten.**

Vereinfachte Darstellung der gesunden Haut im Vergleich zur Haut bei AD. Bei Gesunden ist die Hautbarriere intakt und Allergene können nicht eintreten. Außerdem kann das Wasser in der Haut gehalten werden. Bei AD-Patienten ist die Hautbarriere gestört. Allergene können die Hautbarriere durchdringen und Wasser tritt aus. Durch die Allergene kommt es zur Irritation und Inflammation. Entzündungszellen wandern vermehrt in die Haut ein. Die in der Abbildung aufgeführten Zellen wurden in dieser Untersuchung gemessen und näher charakterisiert. Modifiziert nach Weidinger et al, 2018 (1).

Die intakte Hautbarriere bei AD-Patienten ist u.a. durch genetische Faktoren bedingt gestört. Allergene können erleichtert eintreten und Wasser tritt aus. Die Haut wird trocken. Weiterhin kommt es durch das Eindringen der Allergene in die Haut zu einer Aktivierung des Immunsystems.

Die AD ist charakterisiert durch eine Typ 2-Immunantwort, die u.a. durch Th2-Zellen, IgE-produzierende Plasmazellen, Mastzellen, Eosinophile und Basophile Granulozyten sowie ILC2s (type 2 innate lymphoid cells) vermittelt wird (20). Diese ist durch die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 gekennzeichnet (21). Die Zellen sind normalerweise an der Abwehr von parasitären Infektionen und der Wundheilung beteiligt. Bei



AD-Patienten treten Reaktionen gegen harmlose Umweltantigene, wie z.B. Pollen oder Hausstaubmilben, auf (20).

Ein Großteil dieser Zelltypen wie Eosinophile Granulozyten (Eosinophile), ILC2s, T-Zellen, insbesondere Th2- und regulatorische T-Zellen (Tregs), NK-Zellen und B-Zellen wurden in dieser Untersuchung gemessen und charakterisiert (s. Abbildung 2).

### **1.2.1 Hautbarrierestörung**

Die AD hat eine genetische Komponente, die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen beträgt ca. 77 % (5; 18). Genetische Veränderungen von Hautbarriereproteinen können eine Ursache für eine gestörte epidermale Barriere sein. Neben anderen Genveränderungen ist beispielsweise die „Loss-of-function“-Mutation des Filaggrinproteins bekannt, die eine starke Assoziation mit der AD aufweist (22; 23). Filaggrin ist ein von Keratinozyten gebildetes Strukturprotein der Epidermis, das die Keratinfilamente miteinander vernetzt. Bei Veränderung des Proteins ist die Hautbarriere gestört. In der Folge können Allergene und Mikroben leichter eindringen (23).

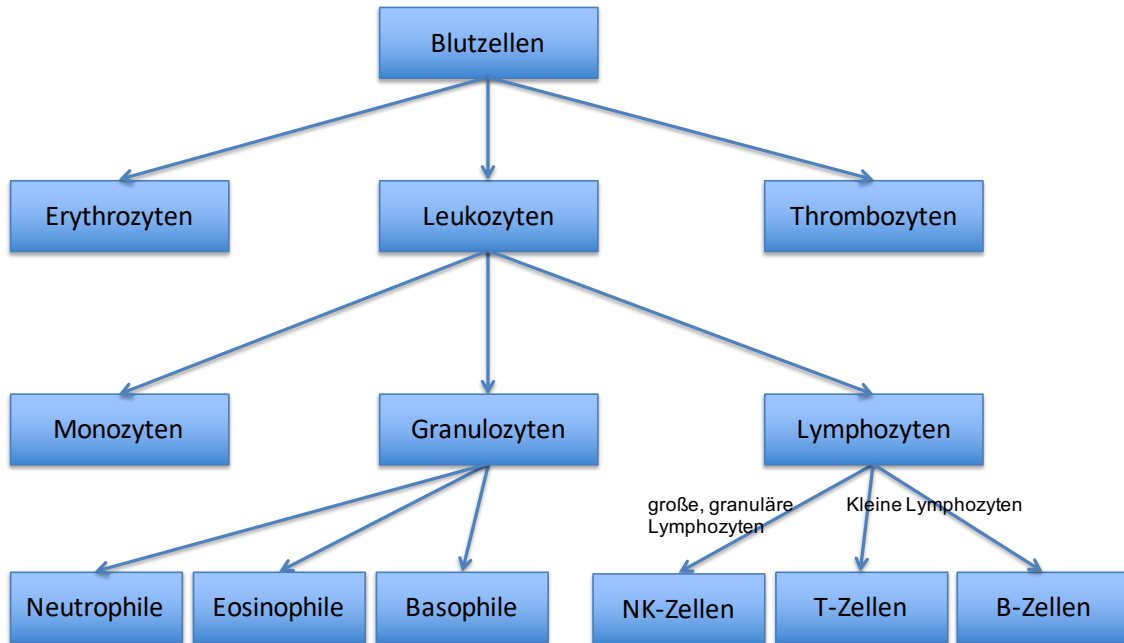
Außerdem ist bei AD-Patienten die Lipidzusammensetzung im Stratum corneum verändert. Dies führt zu geringerer Kapazität der Wasserspeicherung, vermehrtem transepidermalem Wasserverlust und erhöhtem pH-Wert der Haut (24). Weiterhin ist eine verstärkte Serinproteasenaktivität mit einer gestörten Barrierefunktion, Irritation der Haut und einer verminderten Kapazität, Wasser zu speichern assoziiert (25). Diese Veränderungen können zu Trockenheit der Haut führen und zusätzlich das Eindringen von allergenen oder toxischen Substanzen ermöglichen (s. Abbildung 2).

### **1.2.2 Die Rolle des Immunsystems in der AD**

Bei AD-Patienten wurden Gene gefunden, die mit einem erhöhten Risiko für eine gestörte Immunantwort assoziiert sind (18). Die in die Haut eindringenden Pathogene und Allergene lösen eine verstärkte Immunantwort aus und bewirken das Einwandern von Entzündungszellen in die Haut. Hierbei sind verschiedene Zelltypen beteiligt.

Die Blutzellen können generell in drei Zelllinien eingeteilt werden: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. In dieser Untersuchung wurden Leukozyten näher untersucht, da sie einen wichtigen Teil des Immunsystems ausmachen und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Die Leukozyten werden in Monozyten, Granulozyten (Eosinophile, Neutrophile, Basophile) und Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen) unterteilt (s. Abbildung 3).



**Abbildung 3: Einteilung der Leukozyten.**

In dieser Studie wurden die weißen Blutzellen (Leukozyten) untersucht. Sie werden in weitere Subpopulationen unterteilt.

Hierbei wird zwischen angeborener und erworbener Immunität unterschieden. Beispielsweise wehren Granulozyten und Monozyten als Teil des angeborenen Immunsystems Pathogene unspezifisch ab. Lymphozyten gehören der adaptiven/ erworbenen Immunität an. Kennzeichnend hierfür sind die hohe Spezifität und die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis zu bilden.

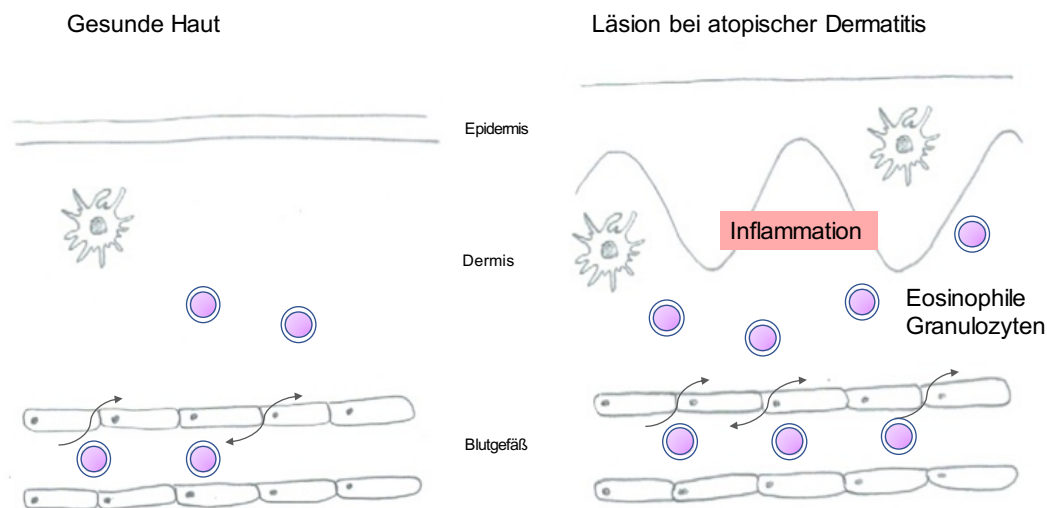
Leukozyten exprimieren Antigene, die in der Cluster of Differentiation (CD)-Nomenklatur klassifiziert werden. Eine CD-Nummer wird einer Gruppe oder einem Cluster von monoklonalen Antikörpern zugeordnet, die das gleiche Antigen erkennen. So kennzeichnet CD3 bspw. spezifisch T-Zellen (Lineage-Marker/ Zelllinienmarker). Andere Zellsubpopulationen können weiterhin durch Markerkombinationen phänotypisch charakterisiert werden (26).

Im Folgenden werden die untersuchten Untergruppen der Leukozyten eingeführt.

### 1.2.2.1 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, d.h. sie wehren Pathogene unspezifisch ab. Sie machen etwa 1-3 % (50-250 Eosinophile/ $\mu\text{l}$ ) der Leukozyten im Blut aus. Durch Freisetzung der in ihren Granuolen enthaltenen vier Hauptproteine, nämlich Eosinophile Peroxidase, Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP) und Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) sowie Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren können sie Entzündungsprozesse fördern. Mittels Antigenpräsentation stellen sie eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar (27).

Zu den physiologischen Funktionen zählt die Abwehr von Infektionen durch Helminthen, Viren, Bakterien und Pilze. Allerdings spielen sie auch in der Pathogenese von allergischen Krankheiten eine Rolle (28). Bei AD-Patienten tritt häufig eine Eosinophilie im Blut auf (29-31). IL-5, das von Th2-Zellen sezerniert wird, verstärkt die Bildung, Chemotaxis und Zellaktivierung der Eosinophilen und führt zu einer verspäteten Apoptose. Außerdem ist IL-5 an der Mobilisierung der Eosinophilen aus dem Knochenmark beteiligt (32). Bei Inflammation werden Zytokine ausgeschüttet, die die Eosinophilen in die Haut locken (s. Abbildung 4) (27; 33; 34).



**Abbildung 4: Vermehrte Eosinophilenfrequenzen in Blut und Haut bei AD.**

Modell einer Hautläsion bei AD-Patienten. Eosinophile sind vermehrt im Blut zu finden und wandern ebenfalls in Hautläsionen ein. Dort kommt es zu verstärkter Inflammation.

### 1.2.2.2 NK-Zellen

In den letzten Jahren wurde innerhalb des angeborenen Immunsystems eine Zellfamilie der lymphatischen Reihe charakterisiert, die weder B- noch T-Zellrezeptor exprimieren. Diese Gruppe wird als innate lymphoid cells (ILCs) bezeichnet (35).

Die Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden der Gruppe 1 der ILCs zugeordnet (35). Sie machen etwa 10 % der Lymphozyten aus. Die im menschlichen Blut vorkommenden NK-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche CD56 und nicht den T-Zellrezeptor CD3 (folglich: CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) (36).

CD56 (ein neuronales Zelladhäsionsmolekül) ist der Leitmarker, der in seiner Intensität auch für eine Einteilung in Subpopulationen der NK-Zellen in CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> und CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> verwendet wird. Hierbei machen die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bis zu 90 % der gesamten NK-Zellen aus (36). Sie sind überwiegend im Blut zu finden und übernehmen hauptsächlich zytotoxische Aktivität durch Sekretion von z.B. Granzym und Perforin. Die CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> Zellen sind dagegen häufiger im Gewebe zu finden und produzieren Zytokine (37; 38).

NK-Zellen spielen weiterhin durch die Interaktion mit Dendritischen Zellen und T-Zellen eine Rolle in der erworbenen Immunabwehr und sind bedeutend in der Regulation der Autoimmunität und Immuntoleranz (36; 39).

### 1.2.2.3 Innate lymphoid cells 2 (ILC2s)

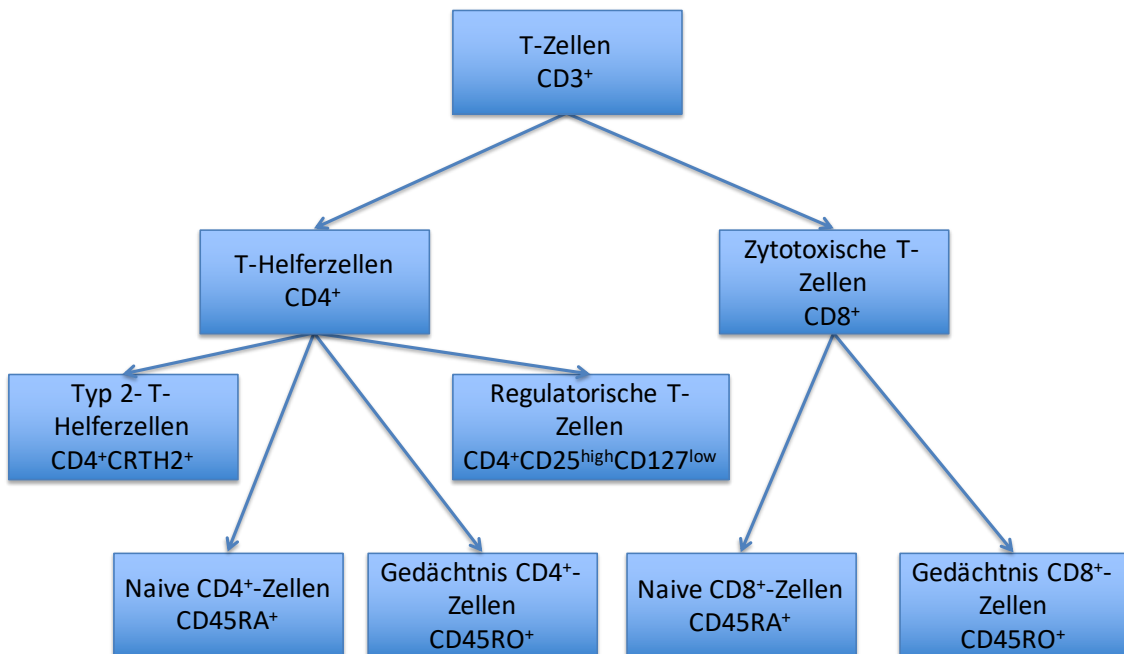
Die Gruppe 2 der innate lymphoid cells (ILC2s) ist eine seltene Immunzellpopulation, die erst vor einigen Jahren im Detail beschrieben und der Typ 2-Immunantwort zugeordnet wurde (20; 40). ILC2s produzieren Zytokine wie IL-5 und IL-13. Damit beeinflussen sie die Rekrutierung, das Überleben und die Funktion anderer Immunzellen und fördern Entzündungsprozesse (20). Außerdem können sie in geringen Mengen IL-4 sezernieren (41). Epithelzellen können bei Aktivierung Entzündungsmediatoren freisetzen, die die Proliferation und das Überleben der ILC2s fördern (42). In der Haut von AD-Patienten wurden erhöhte Frequenzen von ILC2s gefunden (43). Ob diese Zellen direkt für die Entzündung verantwortlich sind oder durch die Entzündungsprozesse dorthin migrieren und sekundär beteiligt sind, ist bisher nicht geklärt.

### 1.2.2.4 T-Zellen

In der Literatur wird die AD auch als T-Zellgesteuerte Erkrankung beschrieben (6; 12). Diese Annahme wird durch das Ansprechen der AD auf Therapeutika, die die T-Zellantwort beeinflussen, unterstützt. Ein Beispiel hierfür ist das Medikament Ciclosporin A, das über Calcineurinblockade die Aktivierung, die Produktion entzündungsfördernder Zytokine (IL-2) und die Differenzierung der T-Zellen inhibiert (44).

T-Zellen sind ein Teil des erworbenen Immunsystems und machen etwa 20-30 % der Leukozyten im Blut aus (45). Mithilfe spezifischer Zellmarker-Kombinationen können sie in T-Helferzellen, regulatorische (Tregs) und zytotoxische T-Zellen sowie weitere Subpopulationen unterteilt werden (s. Abbildung 5).

T-Zellen exprimieren den für sie charakteristischen Marker CD3. Dieser bildet mit dem T-Zellrezeptor (TCR) einen Komplex, ermöglicht so die Expression des TCRs und ist für die Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere zuständig (46). CD4 ist auf T-Helferzellen und Tregs exprimiert. CD8 kennzeichnet dagegen zytotoxische T-Zellen. Eine Differenzierung innerhalb der CD4- und CD8-Zellen in naive und Gedächtniszellen erfolgt mit CD45RA und CD45RO. Außerdem können durch Kombination weiterer Marker spezifische Subpopulationen genauer charakterisiert werden.



**Abbildung 5: Identifikation einzelner T-Zellpopulationen.**

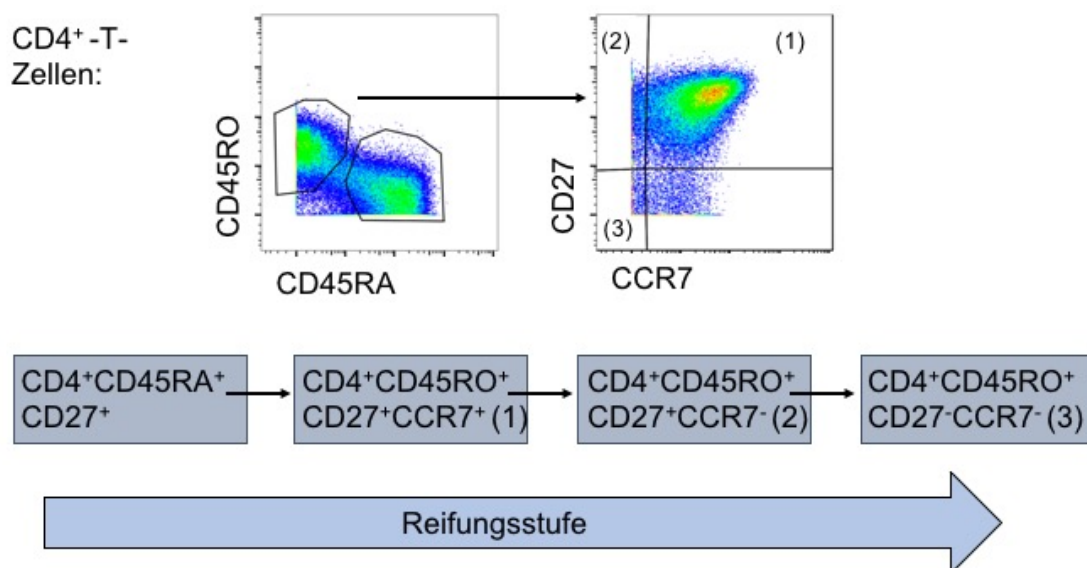
Die T-Zellen werden in verschiedene Subpopulationen unterteilt, die charakteristische Oberflächenproteine exprimieren. Mithilfe dieser lassen sich die Zellen identifizieren und weiter in spezifische Subpopulationen unterteilen. Jede Subpopulation übernimmt spezifische Aufgaben.

T-Zellen übernehmen wichtige und vielseitige Funktionen in der Immunabwehr. CD4<sup>+</sup>-Zellen produzieren Zytokine für die Triggerung von humoraler und zellvermittelter Immunantwort. Außerdem können sie eine Immunantwort supprimieren (47).

CD8<sup>+</sup>-Zellen übernehmen hauptsächlich Effektorfunktionen. Sie kontrollieren alle Körperzellen durch das Überprüfen der auf MHC I (Haupthistokompatibilitätskomplex) präsentierte zelleigenen Antigene und können zytotoxische Reaktionen auslösen (45).

Die Expression des Markers CD45RO charakterisiert T-Gedächtniszellen. CD45RO zeigt, dass schon einmal Kontakt zum Allergen bestand (48).

Eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) wird von Effektor-Gedächtniszellen gebildet, die mit dem Homing-Rezeptor für lymphatisches Gewebe CCR7 (CD197) identifiziert werden können (49). Die Differenzierungsstufen der Gedächtniszellen können mit CD27- und CCR7-Expression charakterisiert werden: Aus CD27<sup>+</sup>-naiven T-Zellen entwickeln sich CD4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>-Gedächtniszellen. Diese verlieren bei weiterer Reifung die CCR7 Expression (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) und werden durch Verlust der CD27 Expression zu endgültig differenzierten CD4<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> Gedächtniszellen. Es scheint also eine stufenweise erfolgende Herunterregulierung von zunächst CCR7 und anschließend CD27 bei der Reifung der CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen vorzuliegen (Abbildung 6) (49).



**Abbildung 6: Differenzierung der CD4<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen.**

CD4<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) können mit CCR7 und CD27 in verschiedene Differenzierungsstufen eingeteilt werden. Der Verlust dieser beiden Marker zeigt eine höhere Differenzierungsstufe.

Zu den T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>-Zellen) gehören auch Th2-Zellen, die neben der Abwehr von Parasiten an Allergen-bedingten/allergischen Entzündungsprozessen beteiligt sind und durch Auslösen der Typ 2-Immunantwort für die AD bedeutend sind (50). Die Th2-Zellen schütten Interleukine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL17E/IL-25) aus, welche u.a. zu einem IgE-Klassenwechsel (u.a. IL-4 und IL13 zusammen mit Signalen von Th2-Zellen) führen und die Differenzierung und Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen fördern können (22; 50-52). Für die Identifikation der Th2-Zellen wird der Prostaglandin-DP2-Rezeptor (CRTH2, chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells, CD294) genutzt. Er ist spezifisch und innerhalb der T-Zellen weiterhin nur auf einem Subtyp der zytotoxischen T-Zellen (Typ 2 zytotoxische T-Zelle) exprimiert (50; 53).

Die regulatorischen T-Zellen sind eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup>-Zellen. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs werden im Thymus gebildet und machen ca. 5-10 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im peripheren Blut aus (54; 55). Sie sind charakterisiert durch die Expression der Oberflächenmarker CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> sowie größtenteils CD127<sup>-/low</sup>. CD25 stellt als Teil des IL-2-Rezeptors einen Korezeptor dar. Er ist auf allen Tregs exprimiert (56). CD127 ist der Rezeptor für IL-7 (57). Weiterhin kann auch der Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead Box Protein 3) zur Identifikation der Tregs genutzt werden (58).

Tregs sezernieren Zytokine und regulieren so direkt oder indirekt das Überleben und die Aktivität von Th1- und Th2-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen sowie Keratinozyten und beeinflussen den Isotyp der von Plasmazellen sezernierten Antikörper (59). Außerdem sind sie an der Ausbildung einer Toleranz beteiligt (60). Eine mögliche Assoziation der AD mit dem IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) deutet auf eine Rolle der Tregs in der Pathogenese der AD hin (61). Es tritt bei Personen mit einer Mutation des FoxP3 auf, der für die Differenzierung von Tregs essentiell ist (62).

#### **1.2.2.5 B-Zellen**

Voruntersuchungen von B-Zellpopulationen im Blut von AD-Patienten und die Beobachtung einer Symptomlinderung bei AD-Patienten nach Gabe des gegen B-Zellen gerichteten Antikörpers Rituximab geben einen Hinweis darauf, dass B-Zellen an der Pathogenese der AD beteiligt sein könnten. In dieser Untersuchung wurden B-Zellen und deren

Subpopulationen klassengewechselte Gedächtnis ( $\text{IgD}^-\text{CD27}^+$ )-, naive ( $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$ ) und nicht-klassengewechselte Gedächtnis ( $\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ )-B-Zellen im Blut gemessen (63-65). Der Klassenwechsel bei B-Zellen bezeichnet einen Isotypenwechsel bezüglich der Immunglobulinexpression.

B-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem und sind hoch spezifisch für ein Antigen. Sie sind Teil des immunologischen Gedächtnisses, insbesondere durch die Bildung von Antikörpern und sind somit wichtig für die humorale Immunität. B-Zellen sind ferner Antigen-präsentierende Zellen und interagieren mit T-Zellen und aktivieren diese über MHC II (65). Außerdem können B-Zellen Chemo- und Zytokine produzieren (65).

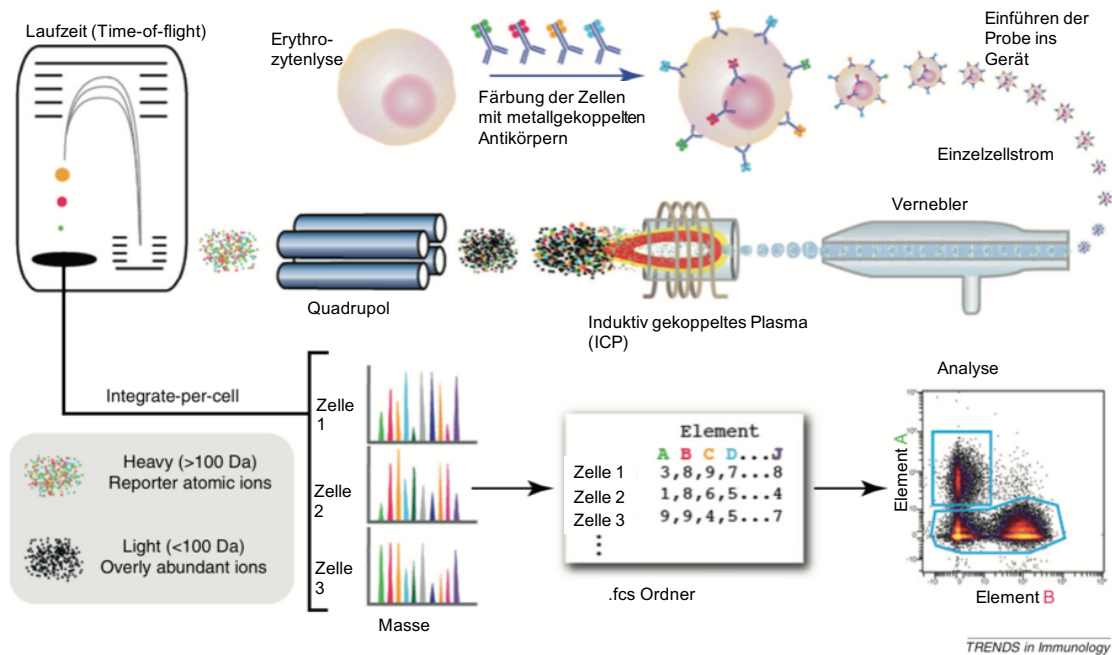
### **1.3 Cytometry by Time-of-Flight (CyTOF)-Methode (Massenzytometrie)**

In dieser Untersuchung sollte ein möglichst umfassender Einblick über das Vorkommen verschiedener Leukozytenpopulationen von AD-Patienten und Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen gewonnen werden. Hierzu wurde der Phänotyp der einzelnen Zellen in einer Blutprobe massenzytometrisch bestimmt und quantifiziert.

#### **1.3.1 Funktionsprinzip des CyTOF-Instruments und Vergleich zur Durchflusszytometrie**

Das Cytometry by Time-of-Flight Instrument, kurz CyTOF, ist eine relativ neue Technologie, die die Massenspektrometrie mit induktiv-gekoppeltem Plasma (ICP-MS) mit der Durchflusszytometrie kombiniert (66). In der Zytometrie können Zellen mit Antikörpern gefärbt werden, die gegen CD-Antigene auf oder innerhalb der Zelle gerichtet sind. (26). Die Massenzytometrie erlaubt eine Analyse von bis zu 45 Parametern auf einer einzigen Zelle (66). Durch Markerkombinationen ist so die Messung von  $2^{45}$  Populationen möglich. Die Zahl der messbaren Antigene ist damit deutlich höher als bei der konventionellen Durchflusszytometrie. Das Funktionsprinzip des CyTOF-Gerätes ist in Abbildung 7 dargestellt.



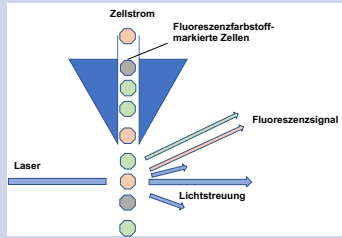
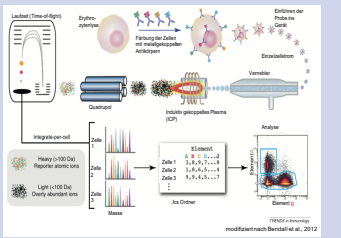


**Abbildung 7: Funktionsprinzip des CyTOF-Instruments.**

Zellen werden mit metallgekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend im Einzelzellstrom in das Messgerät injiziert. Die Zellsuspension wird in Tröpfchen vernebelt. Im Plasma werden die Elemente atomisiert und ionisiert. Die Ionenwolke einer Zelle wird dann in den Quadrupol geleitet, der die schweren Ionen, die isotopgekoppelten Antikörper, von den leichten, häufig vorkommenden Ionen (wie z.B. Sauerstoff) trennt. Die Massentrennung erfolgt im Flugrohr und die Ionen werden anschließend detektiert. Die erhaltenen .fcs-Dateien können mit verschiedenen Programmen ausgewertet werden. Modifiziert nach Bendall et al., 2012 (66).

Für die Färbung werden Antikörper mit Polymer-beladenen aufgereinigten Metall-Isotopen (oftmals Lanthaniden) gekoppelt (67; 68). Die Zellsuspension wird in das CyTOF-Instrument im Einzelzellstrom injiziert. Die Elemente einer Zelle werden im induktiv gekoppelten Plasma (ICP) ionisiert, die gebildete Ionenwolke wird fokussiert und in einem Massenanalysator, dem Flugrohr (Time-of-Flight-Instrument), nach ihrer Masse getrennt (66). Neben Ionen vom Argonplasma werden auch Elemente wie Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff, aus denen eine Zelle zusammengesetzt ist, ionisiert und in einem Quadrupol eliminiert (66). Restliche Ionen aus einer Zelle werden innerhalb von ca. 300  $\mu$ s alle 13  $\mu$ s gescannt und an einem Elektronenvervielfacher detektiert. Die Daten werden in einer Datei des .fcs-Formats gespeichert (66). Durch Verwendung von Metall-Isotopen zur Markierung der Zellen, die üblicherweise weder in einer Zelle noch im Labor vorkommen, gibt es wenig Hintergrundsignale (66).

**Tabelle 2: Gegenüberstellung Massen- (CyTOF) und Durchflusszytometrie.**

Variable	Durchflusszytometrie (FACS)	CyTOF
Prinzip		
Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff-markiert	Metall-gekoppelt
Anzahl der Parameter	Bis zu 18	Bis zu 45*
Zellen/ s	25 000	500-1000*
Zellen/ h	25-60 Mio	2 Mio*
Effizienz der Probenmessung	>95 %	<30 %
Messstrategie	Gezielt	Ungezielt
Hypothese	Gezielte Hypothese	Hypothese generieren

CyTOF-Prinzip modifiziert nach Bendall et al, 2012 (66); \* abhängig von Gerätemodell

Im Gegensatz zur CyTOF-Messmethode werden bei der Durchflusszytometrie Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper eingesetzt. Die markierten Zellen werden dann in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert, sodass sie einzeln das kohärente Licht von einem oder mehreren hintereinander gekoppelten Lasern passieren. Das dabei entstandene Streu- und Fluoreszenzlicht wird durch Photodetektoren gemessen und die Ergebnisse als Datei des .fcs-Formats gespeichert. Beide Messmethoden sind in Tabelle 2 gegenübergestellt.

## **2 Fragestellung und Ziel der Untersuchung**

In dieser Arbeit wurde erstmals mit der Massenzytometrie das gesamte Leukozytenkompartiment im Blut von Patienten mit moderater und schwerer AD sowie gesunden Probanden hochaufgelöst qualitativ und quantitativ analysiert und miteinander verglichen. Ziel unserer Untersuchung war dabei, bedeutsame Immunzellen für die Pathogenese sowie die Krankheitsaktivität zu identifizieren. Sollten sich spezifische Zellkonstellationen nachweisen lassen, könnten diese Ergebnisse zukünftig dazu beitragen, individualisierte, kausale Therapiekonzepte zu entwickeln.

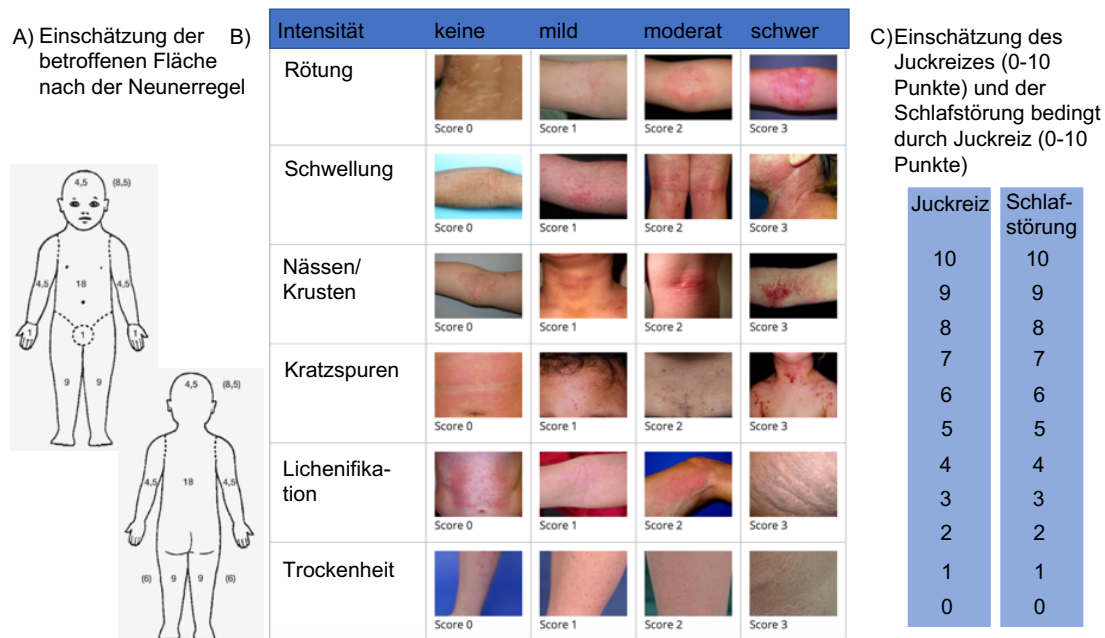
### 3 Patienten und Methode

#### 3.1 Aufbau der Untersuchung

Um bisher unbekannte Mechanismen der Pathogenese der AD besser zu verstehen, wurden in dieser Untersuchung Immunzellen im peripheren Blut von 60 Probanden untersucht. Hierzu wurde erstmals eine neue massenzytometrische Technik (CyTOF) verwendet.

Im Zeitraum von Mai 2016 bis September 2016 wurden in der Klinik für Dermatologie der Charité Mitte (Charitéplatz 1, 10117 Berlin) 40 Patienten mit AD und 20 Kontrollen rekrutiert. Die Einteilung der Patienten in Gruppen erfolgte nach Schweregrad mithilfe des SCORADs in schwere AD (SCORAD  $\geq 40$ ) und moderate AD (SCORAD 15 bis  $< 40$ ) (69).

Der SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis) ist ein international anerkanntes, klinisches Messinstrument zur objektiven Einschätzung des Schweregrades der AD bei Patienten. Er wurde von der European Task Force on Atopic Dermatitis entwickelt und wird in verschiedenen klinischen Studien empfohlen (69; 70).



**Abbildung 8: Erhebung des SCORADs.**

Zur Berechnung des SCORADs werden die betroffene Fläche (A), Charakteristika der Läsion (B) sowie Juckreiz und Schlafstörung (C) beurteilt. 0 = kein Juckreiz bzw. keine Schlafstörung; 10 = stärkster Juckreiz bzw. sehr ausgeprägte Schlafstörung. Die Punkte werden nach der Formel  $A/5+7B/2+C$  addiert. B) Modifiziert nach <https://www.dermnetz.org/topics/scorad/> (71).

Der SCORAD setzt sich aus drei Kategorien (A, B, C) zusammen (s. Abbildung 8): Ausbreitung der Läsionen, Intensität der Läsionen und subjektive Symptome. **A:** Hier wird der Anteil der betroffenen Areale mithilfe der Neunerregel beurteilt. **B:** Erythem, Ödem/Papeln, Krusten, Exkoration, Lichenifizierung und Trockenheit werden mit einem Punktesystem von 0 bis 3 (keine, mäßig, moderat, schwer) beurteilt. **C:** Bei den subjektiven Symptomen werden Juckreiz sowie Schlafstörungen aufgrund von Juckreiz bezogen auf die letzten drei Tage auf einer Skala von 0 bis 10 von dem Patienten eingeschätzt, wobei 10 der stärkste Juckreiz ist, den der Patient je erfahren hat.

Die Gesamtpunktzahlen der Kategorien A-C werden dann nach der Formel  $A/5+7B/2+C$  addiert. Die maximale Punktzahl beträgt 103 Punkte.

In die Untersuchung wurden Patienten im Alter von 18 bis 55 Jahren mit extrinsischer Form der AD mit nachgewiesenen Typ I- Sensibilisierungen (Gesamt-IgE >100 kU/ l) und typischer Ekzemmanifestation (Extremitätenbeugen, Gesicht, Hände) eingeschlossen (8). Die Patienten mussten einen SCORAD  $\geq 15$  aufweisen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Systemtherapie, z.B. Ciclosporin A oder Azathioprin, oder Patienten mit Infekt in den vergangenen 14 Tagen.

Als Kontrollen wurden Personen ohne Eigen- oder Familienanamnese einer Krankheit aus dem atopischen Formenkreis (AD, Rhinokonjunktivitis, Asthma) oder sonstige Erkrankungen eingeschlossen. Eine Medikamenteneinnahme war nicht erlaubt. Die Kontrollpersonen mussten wie die Patienten infektfrei sein.

Die Patienten wurden aus der Atopie-Sprechstunde der Klinik für Dermatologie der Charité Berlin-Mitte rekrutiert oder telefonisch einbestellt.

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung der Patienten und Probanden gemäß Ethikvotum (EA1/080/16) und Datenschutzvotum (AZ123/16) wurde von jedem Teilnehmer eine schriftliche Einwilligung eingeholt.

Es erfolgte eine Entnahme von max. 30 ml Blut, wobei, wenn möglich, auch 10 ml Serum für spätere Analysen gewonnen und bei -80 °C eingefroren wurden.

Um die Spezifität und Qualität der Messungen zu erhöhen sowie interindividuelle Schwankungen zu verringern wurden je drei Probanden pro Messtag rekrutiert.

Die einzelnen Ablaufschritte dieser Untersuchung sind in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Überblick über Ablauf der Untersuchung.**

Dargestellt ist der grobe Ablauf der Studie. 60 Probanden wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Bei den 40 AD-Patienten wurde der genaue SCORAD erhoben. Die Blutproben wurden im Labor gefärbt und am CyTOF gemessen. Nach Aufbereitung der Daten erfolgte die Auswertung (s. Abbildung 10).

**3.1.1 Fallzahl**

Die Studie hat den Charakter einer Pilotstudie. Daher konnte zunächst keine Fallzahlplanung durchgeführt werden. Dennoch wurde angenommen, dass ein standardisierter Effekt von 0,96 unter folgenden Bedingungen nachweisbar sei:

- 18 Teilnehmer (+2 Teilnehmer zur Kompensation für mögliche Datenverluste)
- eine Effektstärke von 80 %
- ein 2-seitiger Fehler 1. Art von 5 %
- t-Test als Auswertmethode
- Varianzgleichheit

Bei nicht-parametrischen Verteilungen mit den gleichen Bedingungen wäre nach statistischer Voranalyse eine Wahrscheinlichkeit von  $P(X<Y)= 0,77$  nachweisbar.

**3.2 Zellvorbereitung und Messung**

**3.2.1 Antikörper**

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten 35 Parameter parallel auf einer Zelle mit der CyTOF-Technologie gemessen werden.

Jeder Antikörper war hierfür mit einem spezifischen Metall-Isotop gekoppelt. Antikörper-Konjugate wurden entweder kommerziell erworben oder unkonjugierte Antikörper von verschiedenen Herstellern wurden individuell unter Verwendung eines Maxpar Kits nach Anweisung des Herstellers mit dem gewünschten Metall-Isotop gekoppelt. Die Antikörper wurden dann in Zielkonzentrationen von 1:50 bis 1:1600 auf Zellen austitriert und in einem Panel zusammengestellt (s. Tabelle 3).

Der CRTH2-Antikörper zeigte nach 7 Messungen (n=7 pro Untersuchungsgruppe) kein valides Signal mehr. Unter Berücksichtigung der Beschaffungs- und Kopplungszeit eines neuen Antikörpers, der Halbwertszeit der anderen Antikörper sowie einer

Zwischenanalyse spezifischer CRTH2-tragender Subpopulationen (ILC2, Th2-Zellen), wurde bei den folgenden Messungen auf den Antikörper verzichtet.

**Tabelle 3: Antikörperliste.**

Antikörper	Klon	Isotop	Bezugsquelle	Expression auf	Funktion
CD1c	L161	158 Gd	Miltenyi	mDCs	Präsentation lipider Antigene
CD3	UCHT1	170 Er	Fluidigm	T-, NKT-Zellen	T-Zell-Ko-Rez.; Signaltransduktion
CD4	RPA-T4	144 Nd	Biologend	Monos, MΦ, Th-Zellen	Ko-Rez. auf T-Zellen Erkennung MHC-II-Signale
CD8	SK1	168 Er	Fluidigm	Zytotox. T-, NK-Zellen	Ko-Rez. auf T-Zellen Erkennung MHC-I-Signale
CD11c (Integrin $\alpha$ -X)	Bu15	160 Gd	Biologend	DCs, NK-Zellen, akt. T-Zellen	Adhäsion
CD14	RMO52	171 Yb	Beckman Coulter	Monos, MΦ	Rez. für LPS-Komplex und LBP
CD15	W6D3	175 Lu	Biologend	Neutros, Eos	Adhäsion
CD16	3G8	169 Tm	Biologend	Neutros, MΦ, NK-Zellen	Fc-Rez., vermittelt Phagozytose und ADCC
CD19	Bu-12	142 Nd	DRFZ	B-Zellen, Plasmazellen	Ko-Rez. für B-Zellen
CD20	2H7	147 Sm	Fluidigm	B-Zellen	n.b.
CD25 (IL2R $\alpha$ )	2A3	149 Sm	Fluidigm	Akt. T- und B-Zellen, MΦ, nicht-akt. CD4 <sup>+</sup> Tregs	$\alpha$ -Kette von IL-2Rez.
CD27 (CD70-Ligand)	L128	167 Er	Fluidigm	T-, NK-, einige B-Zellen	CD70-Rez.; TNF-Rez.
CD36 (GPIV; GPIIb)	AC106	166 Er	Miltenyi	Monos	Erkennung und Phagozytose apoptot. Zellen
CD38	HIT2	172 Yb	Fluidigm	Plasma-, akt. T-, B-, NK-Zellen	Erhöht B-Zellprolif., Ko-Stim.; Leukozytenmigration durch Interaktion mit CD31
CD45RA	4G11	152 Sm	DRFZ	T-, B-Zellsubpopulationen; Monos, MΦ	Isoform von CD45
CD45RO	UCHL1	146 Nd	DRFZ	T-, B-Zellsubpopulationen, Monozyten	Isoform von CD45
CD56	REA196	148Nd	Miltenyi	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD69	FN50	162 Dy	Fluidigm	Akt. T- und B-Zellen; aktivierte MΦ und NK-Zellen	Aktivierungsmarker, Zelladhäsion
CD107A (LAMP-1)	H4A3	143Nd	Miltenyi	Akt. T-Zellen, Neutros, NK-Zellen	Zellaktivierung, Degranulations-assoziiert
CD123	6H6	151 Eu	Fluidigm	Eosinophile, DCs	IL-3Rez. $\alpha$ -Kette
CD127	A019D5	165 Ho	Fluidigm	Pro-B-, reife T-Zellen, Monos, Tregs	IL-7Rez. $\beta$ -Kette
CD161	HP3G10	173 Yb	Biologend	NK-, T-Zellen, ILC2	Regulation NK-Zellzytotox.
CD169 (Siglec1)	7-239	150 Nd	Miltenyi	Subpopulationen von MΦ	Adhäsionsmolekül
CD185 (CXCR5)	REA103	145 Nd	Miltenyi	B-Zellen, Monos; CM CD4-T-Zellen; folliculäre Th-Zellen	Chemokin-Rez.; Chemotaxis B-Zellen

CD194 (CCR4)	REA279	161 Dy	Miltenyi	Akt. Th2-Zellen, Tregs; B-Zellsubpopulationen, (akt.) NK-Zellen, Basos, Monos	Chemokin-Rez.
CD195 (CCR5)	REA245	155Gd	Miltenyi	T-Zellen, MΦ, DCs, etc.	Chemotaxis der Leukos; Chemokin-Rez.
CD196 (CCR6)	G034E4	141Pr	Fluidigm	T-Zellen; naive und Gedächtnis-B-Zellen, nicht-reife DCs	Chemokin-Rez.; Chemotaxis DCs, T-, B-Zellen
CD197 (CCR7)*	G043H7	159 Tb	Fluidigm	DCs, MΦ, B-, NK-, T-Zellen	Chemokin-Rez.; Unterscheidung von T-Zellsubpopulationen (CCR7 und CD45RA)
CD279 (PD1)	PD1.3.1.3	154 Sm	Miltenyi	Akt. Lymphozyten	Reguliert Gleichgewicht zw. T-Zellakt., Toleranz und Immunopathologie
CD294 (CRTH2)	BM16	163 Dy	Fluidigm	Th2-Zellen, ILC2s, Eos, Basos	Rezeptor, ggf. Verstärkung Th2-Antwort bei allerg. Reaktionen
CD303 (BDCA2)	201A	153 Eu	Fluidigm	DCs	Identifikation von pDCs
IgD	IgD26	164 Dy	Miltenyi	B-Zellen	Antikörper vor Isotypenklassenwechsel
Siglec 8	7C9	156Gd	Miltenyi	Eos, Basos, Mastzellen	Quervernetzung führt zu Apoptose von Eos
HLA-DR	L243	174 Yb	Fluidigm	B-, akt. T-Zellen, Monos, DCs	Präsentation von Peptid-Ag
CD45	5B1	176 Yb 113 In 115 In	Miltenyi	Leukozyten; Barcode 1-3	Pan-Leukozytenmarker, Beeinflusst Signaling von T- und B-Zell-Rez.
DNA Interkalator	201A	Ir191/Ir193	Fluidigm		Färbt DNA an
Lebend_Tot		194Pt			markiert tote Zellen

Angaben zu den verwendeten Antikörpern, deren Expression und zur Funktion, der erkannten Moleküle.  
Basos Basophile; DCs Dendritische Zellen; Eos Eosinophile MΦ Makrophagen, Monos Monozyten; Rez. Rezeptor; Tregs regulatorische T-Zellen; n.b. nicht bekannt

Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.



**Tabelle 4: Materialliste.**

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Erylysis buffer	Qiagen, Deutschland
CSM (Färbemedium)	500 ml Ca- und Mg-freiem PBS, 2,5 g bovines Serumalbumin (proteasefrei) und 100 mg Natriumazid
1x PBS aus 10x PBS, pH 7,2	Rockland, USA
Saponin-basierter Permeabilisierungspuffer	eBioscience, USA
Beriglobin	CSL Behring, USA
MACSQuant	Miltenyi, Analyzer 10
Formaldehyd-Lösung (4 %) mit PBS aus 16 % Paraformaldehyd	EMS, USA
Polystyren/ Polypropylen-Röhrchen (5/15/50 ml)	Corning, USA Sarstedt, Deutschland
EQ Four Element Calibration Beads	Fluidigm, USA
Waschlösung	Fluidigm
MAXPAR Antibody labeling kit	Fluidigm
CyTOF v1 Instrument mit CyTOF 2 Software, v6.0.626	Fluidigm
Supersampler	Victorian Airship, USA

Die Arbeit erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Immunmonitoring von Dr. Andreas Grützkau (DRFZ, Virchowweg 12, 10117 Berlin). Die von dieser Gruppe bisher etablierten Protokolle zur Färbung von humanen Blutzellen für die massenzytometrische Messung wurden als Grundlage verwendet und weiter an die aktuelle Fragestellung angepasst und etabliert (72). Für die Aufarbeitung der Zellen wurden pro Proband 7 bis 10 ml Heparinblut verwendet. Die Isolierung von Leukozyten erfolgte durch hypotone Pufferzugabe (Erylysis buffer, 10 min Inkubation auf Eis, Zentrifugation 300 g, 10 min, 4 °C). Um eine komplette Lyse der Erythrozyten sicherzustellen, wurde der vorherige Schritt wiederholt (5 min Inkubation auf Eis). Nachfolgend wurden die Zellen mit Färbemedium (CSM) und anschließend mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen (300 g, 10 min, 4 °C). Färbemedium, auch cell staining medium, ist ein Puffer und setzt sich aus 500 ml Calcium- und Magnesium-freiem PBS, 2,5 g bovinem Serumalbumin (proteasefrei) und 100 mg Natriumazid zusammen. 1x PBS wurde aus 10x PBS, pH 7,2 mit deionisiertem Wasser hergestellt.

### **3.2.2 Probenaufbereitung, Färbung und Messung**

Bei Aufnahme von bis zu 2 Millionen Zellen pro Messung mit dem CyTOF-Gerät, müssen Störfaktoren, wie tote Zellen, Doubletten und unspezifische Bindungen der

Antikörper vermindert werden. Hierfür wurden verschiedene Schritte im Färbeprozess durchgeführt:

Nach Lyse der Erythrozyten im Blut wurden die Zellen zur Markierung toter Zellen mit einer Cisplatin-Lösung (stock 25  $\mu\text{M}$ , 1:1000 in PBS) für eine Minute bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Cisplatin dringt in tote Zellen mit kompromittierter Zellmembran ein und bindet dort unspezifisch zelluläre Proteine. Auch intakte Zellen werden markiert, allerdings ist die Markierung von Zellen mit zerstörter Zellmembran wesentlich stärker. Die gebildeten kovalenten Bindungen sind resistent gegenüber Fixierung, Permeabilisierung und Waschschritten. Nicht gebundenes Cisplatin konnte mit Färbemedium ausgewaschen werden (300 g, 10 min, 4°C).

Spezifische und unspezifische Bindungen von Antikörpern wurden durch eine Absättigung von Fc-Rezeptoren mit humanem Immunglobulin sowie über ladungsabhängige Bindungen (160  $\mu\text{g/ml}$  Beriglobin, 10 min Inkubation RT) verhindert.

Für die Quantifizierung von Leukozyten wurden CD45-exprimierende Zellen nach dem Waschen fluoreszenzzytometrisch analysiert (MACSQuant Analyzer 10) und auf eine Zelldichte von  $3 \cdot 10^6$  Zellen eingestellt.

An den einzelnen Messtagen wurden immer drei Proben gleichzeitig prozessiert. Hierzu mussten die Proben mit einem sog. CD45-Barcoding versehen werden. CD45, auch PTPRC (Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C) genannt, ist ein Oberflächenprotein, das auf allen Leukozyten exprimiert wird und sich daher gut für das Barcoding eignet, das im Rahmen dieser Untersuchung vor den Messungen etabliert worden war (73). CD45 wurde mit drei verschiedenen Isotopen ( $^{176}\text{Yb}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{115}\text{In}$ ) gekoppelt. Jedem Donor wurde ein spezifisches Isotop zugeordnet, sodass die Probe eindeutig identifiziert werden konnte. Das Barcoding ermöglicht die Probenaufbereitung unter gleichen Bedingungen und die Färbung mit demselben Antikörpermix, was eine Reduktion des Antikörperverbrauchs bedeutet. Außerdem können Doubletten, d.h. Zellaggregate, besser erkannt und ausgeschlossen werden. Die Laufzeit des CyTOF-Gerätes kann verringert werden und eine Probenverschleppung zwischen den Donoren wird vermieden.

Jeweils  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro Donor wurden für das Barcoding eingesetzt. Hierzu wurden die drei Proben mit je einem der spezifisch gekoppelten CD45-Antikörper (s. Tabelle 3) für 30 min bei RT gefärbt.

Nach dreimaligem Waschen mit Färbemedium wurden die mit dem Barcode versehenen Proben zusammenpipettiert und zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C).

Zur Färbung der verschiedenen Oberflächenmoleküle wurde das Zellpellet mit 100 µl Antikörper-Mastermix für 30 min RT inkubiert (s. Tabelle 3).

Die nicht gebundenen Antikörper wurden mit Färbemedium und PBS abgewaschen. Zur Zellfixierung wurde die Probe in 2000 µl 4 % Formaldehyd in PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe zunächst mit PBS und dann mit Färbemedium gewaschen (700 g, 5 min, 4 °C).

Für die DNA-Färbung wurde ein Iridium-Intercalator (Ir191 und Ir193) verwendet. Durch Detektion der Isotope 191 und 193 parallel auf einer Zelle war eine Einzelzellidentifikation möglich. Die Probe wurde mit 500 µl 1X Ir/Ir NA Intercalator in 10X Perm-Puffer / Aqua dest. (Verdünnung 1:500) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Färbemedium (zweimal, 700 g, 5 min, 4 °C) und deionisiertem Wasser (zweimal, 800 g, 5 min, 4 °C) abgewaschen. Die Zellzahl wurde erneut mit dem MACSQuant bestimmt.

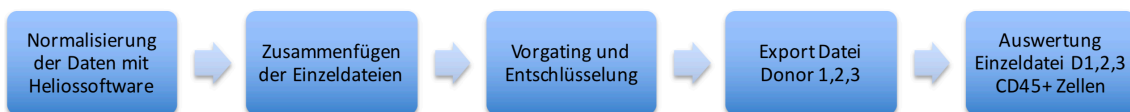
Die Messung einer großen Zellzahl und die damit verbundene lange Messzeit innerhalb eines Experiments führt zu Signalstärkeeinbußen, da eine Anlagerung von Zellmaterial im Instrument stattfindet (74). Außerdem können trotz Säuberung und Kalibrierung des Instruments unterschiedliche Einstellungen in der Sensitivität an verschiedenen Messtagen auftreten. Um Sensitivitätsunterschiede des Gerätes innerhalb und zwischen den Messtagen auszugleichen, werden sog. 4-Elemente-Beads (EQ Four Element Calibration Beads, Fluidigm) als interner Standard der Zellsuspension in bekannter Konzentration vor der Messung zugesetzt (75). Diese enthalten natürlich vorkommendes Cerium ( $^{140/142}\text{Ce}$ ), Europium ( $^{151/153}\text{Eu}$ ), Holmium ( $^{165}\text{Ho}$ ) und Lutetium ( $^{175/176}\text{Lu}$ ). Da Cerium nicht zur Kopplung mit Antikörpern zur Verfügung steht, kann dieses in der Messung gut unterschieden werden. Durch gleichzeitige Messung von Beads und Zellen kann anschließend eine zeitabhängige Korrektur der Intensitäten mithilfe vorhandener Software (Normalisierung) erfolgen.

Die EQ Four Element Calibration Beads wurden im Verhältnis 1 zu 10 mit deionisiertem Wasser verdünnt und die Zellkonzentration wurde für die Messung auf  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ ml mit der verdünnten Bead-Lösung eingestellt. Vor der Messung wurden die Zellen durch einen 30 µm Filter in ein 5 ml Polystyren-Röhrchen filtriert.

Das CyTOF-Gerät wurde regelmäßig nach Angaben des Herstellers vorbereitet (Säuberung und Tuning), um eine annähernd gleiche Messleistung des Gerätes an allen Messtagen zu ermöglichen. Für das Tuning wurde eine Tuning Lösung verwendet. Die EQ™ Four Element Calibration Beads wurden im Rahmen der Qualitätskontrolle nach dem Tuning gemessen. Anschließend wurde das Gerät mit Waschlösung und deionisiertem Wasser gespült.

Danach erfolgte die Messung der Zellen mit dem CyTOF-Gerät. Bei den ersten Messungen wurden die 450 µl Probenschleife alle 500 s manuell mit Zellsuspension durch Injektion mit einer Spritze befüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension in entgegengesetzter Richtung mit deionisiertem Wasser als Trägerflüssigkeit in das Gerät gepumpt. Ab dem 23. Mai 2016 wurde ein Supersampler verwendet, der die Probe automatisch injizierte.

Pro Patientenprobe wurden mindestens 500 000 Zellen aufgenommen, pro Ansatz und Messtag waren es also mindestens 1,5 Millionen Zellen. Der Durchfluss wurde auf ca. 300 Zellen pro Sekunde eingestellt. Während der Messung wurden drei Dateien generiert, um technische Defekte mit Verlust aller Daten zu verhindern. Die verwendeten Beads ermöglichten die Quantifizierung der technischen Variationen in Messungen mit dem CyTOF-Instrument sowie durch eine Normalisierung den Vergleich von zu unterschiedlichen Zeitpunkten und damit unter verschiedenen Laborbedingungen gefärbten und gemessenen Proben verschiedener Patienten (74). Die einzelnen Dateien wurden daher mit der Helios-Software normalisiert und zu einer Datei zusammengefügt. In Abbildung 10 sind die Einzelschritte der Datenprozessierung dargestellt.



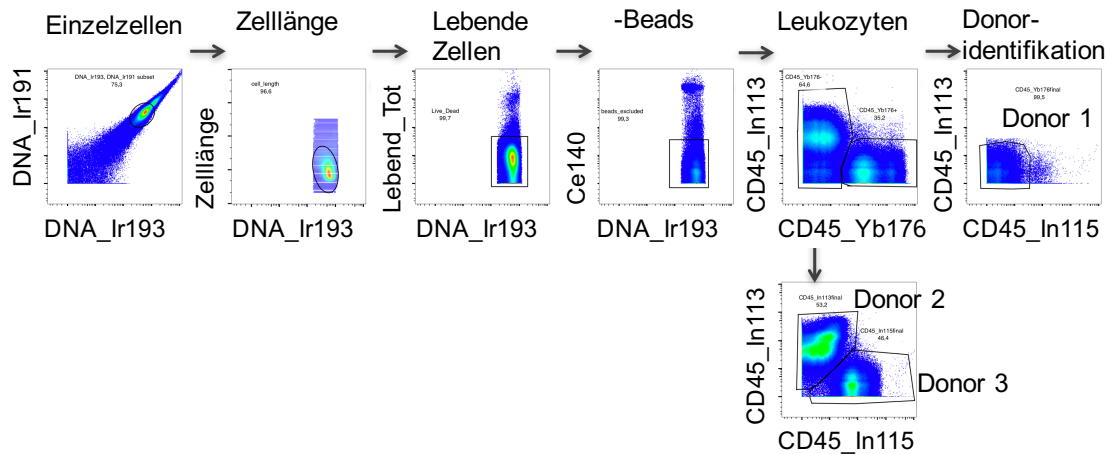
**Abbildung 10: Prozessierung der Daten.**

Um die Daten für jeden Donor auswerten zu können, mussten diese in verschiedenen Schritten bearbeitet werden. Aufgrund der großen Datenmengen wurde jeder Messtag in mehrere Dateien aufgeteilt und abgespeichert. Diese Daten wurden nach der Normalisierung wieder zusammengefügt und nach Vorgating und Identifikation der Donoren (Entschlüsselung der Donor-Markierung) in einzelne Dateien exportiert.

### 3.2.3 Vorgating und Donoridentifikation

Nach den Messungen mussten die Zellen wieder den ursprünglichen Donoren zugeordnet werden. Dazu wurden zunächst Doubletten mithilfe des DNA-Markers und des Zelllängenparameters ausgeschlossen. Desweiteren wurden Cisplatin-positive tote Zellen und

die internen Standardbeads ausgeschlossen bevor dann alle Leukozyten (CD45 positiv) identifiziert werden konnten. Diese wurden in einem weiteren Schritt durch Gegenüberstellung der verschiedenen CD45-Antikörper (176Yb, 113In, 115In) Donor 1-3 zugeordnet (s. Abbildung 11).



**Abbildung 11: Donoridentifikation aus Gesamtdaten.**

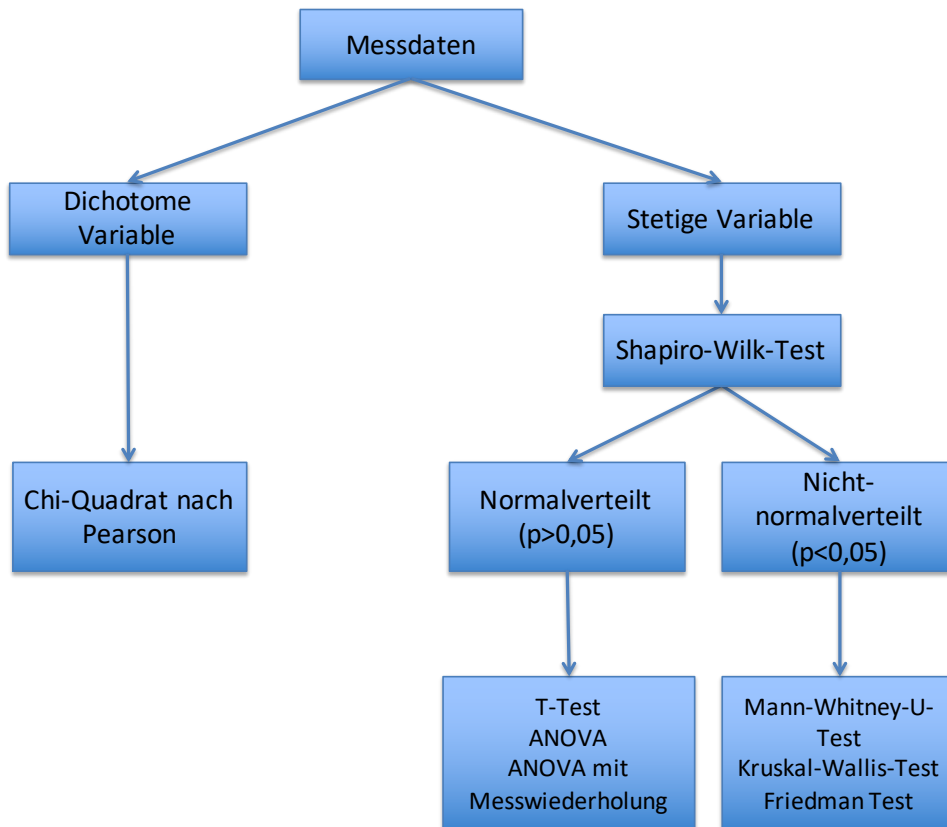
Vorgang zur Donoridentifikation. Lebende, DNA-haltige Einzelzellen wurden eingeschlossen. Die vor der Messung hinzugegebenen Beads wurden ausgeschlossen. Anschließend konnte die Identifikation mithilfe der drei CD45-Antikörper (Donor 1: 176Yb, Donor 2: 113In und Donor 3: 115In) erfolgen.

Für die Auswertung der Daten wurde eine nicht-supervidierte Cluster-Analyse, sog. FlowSOM-Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik, Charitéplatz 1, 10117 Berlin), durchgeführt. (76) Die SOM (self-organizing maps)-Cluster wurden anschließend in 2D-Diagrammen visualisiert und manuell organisiert. (77) Dies ermöglichte einen Überblick über alle Leukozytenpopulationen und mögliche Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen. So konnten ebenfalls bisher nicht bekannte Populationen untersucht werden. Weiterhin wurde eine manuelle Analyse mittels FlowJo-Software (Version 10.2) durchgeführt. Hierbei wurden von Baumgart et al. beschriebene Zellpopulationen gezielt identifiziert. (72) Die manuelle Analyse diente auch zur Verifizierung der Ergebnisse der nicht-supervidierten Analyse.

### 3.3 Statistik

Die Verwaltung der Daten erfolgte mit Excel 2011 (Microsoft).

Für die Berechnung der Statistik und Grafikerstellung wurde das Softwareprogramm SPSS Statistics, Version 23 (IBM), verwendet.



**Abbildung 12: Statistisches Vorgehen.**

Einteilung in dichotome und stetige Variablen. Bei stetigen Variablen wurde zunächst ein Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) durchgeführt. Je nach Verteilung und Anzahl der zu vergleichenden Gruppen wurde ein statistischer Test gewählt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

Es erfolgte eine Einteilung in dichotome und stetige Variablen. Die dichotomen Variablen, wie Geschlecht, wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson auf Signifikanzen getestet. Für stetige Variablen wurde zunächst der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt. In dieser Untersuchung wurden nur unabhängig voneinander erhobene Stichproben untersucht. Je nachdem, ob die Stichproben normal- oder nicht normalverteilt waren, wurde ein Signifikanztest ausgewählt. Für den Vergleich von je zwei Proben wurde bei Normalverteilung ein T-Test, bei nicht-normalverteilten Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Beim Vergleich der Altersverteilung in den drei Untersuchungsgruppen wurde eine ANOVA durchgeführt (s. Abbildung 12).

Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Zur Darstellung der Daten wurden für normalverteilte Daten Balkendiagramme mit 2-fachem Standardfehler (SE) verwendet. Nicht-normalverteilte Daten wurden als Boxplots dargestellt. Hierbei wurde der Median abgebildet, der von einer Box umgeben wird. Diese stellt alle Werte von der 25. bis zur 75. Perzentile dar. Sog. Antennen zeigen die 10. und die 90. Perzentile an. Die Werte, die außerhalb dieses Bereichs lagen, wurden als Sternchen dargestellt. Bei normalverteilten Daten wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) angegeben, bei nicht-normalverteilten Daten der Median und der Interquartilsabstand (IQR).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientencharakterisierung

In dieser Untersuchung wurden 40 AD-Patienten mit 20 gesunden Probanden verglichen (s. Tabelle 5). Es erfolgte eine Einteilung in Gruppen nach dem bei der Untersuchung ermittelten SCORAD in ein Patientenkollektiv mit moderater AD (SCORAD 15 bis <40; ADm) und eines mit schwerer AD (SCORAD  $\geq$ 40; ADs).

Die Gruppen waren hinsichtlich Altersverteilung und Geschlecht vergleichbar ( $P > 0,05$ ; s. Tabelle 5).

Der Mittelwert des SCORADs war in der Gruppe mit schwerer AD etwa doppelt so hoch wie bei ADm-Patienten ( $P < 0,001$ ; s. Tabelle 5).

**Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Untersuchungsgruppen.**

Variable	Gesund	Moderate AD	Schwere AD	P-Wert
Anzahl	20	20	20	n.a.
Geschlecht (w/m)	11/9	8/12	5/15	0,153 <sup>a</sup>
Alter <sup>1</sup> (Jahre)	35,7 $\pm$ 12,0	34,1 $\pm$ 10,2	37,9 $\pm$ 10,9	0,546 <sup>b</sup>
SCORAD <sup>1</sup>	n.a.	28,8 $\pm$ 7,0	56,7 $\pm$ 12,5	<0,001 <sup>c</sup>
Gesamt-IgE (kU/l)	n.a.	2013,5 (522,6-5177,8)	4782,0 (1626,0-12473,0)	0,119 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Mittelwert $\pm$  SD, <sup>a</sup>Chi-Quadrat nach Pearson; <sup>b</sup>ANOVA, <sup>c</sup> T-Test, <sup>d</sup> Mann-Whitney-U-Test  
Charakterisierung der Studienkohorten; Gesamt-IgE ADs-Patienten: n=19

Die Gesamt-IgE-Serumkonzentration der Patienten wurde den Patientenakten entnommen (n=39). Im Serum der Patienten mit moderater und schwerer AD waren die Gesamt-IgE Werte vergleichbar. Eine lineare Regression zwischen Gesamt-IgE Konzentration und SCORAD zeigte keinen Zusammenhang ( $R^2=0,076$ ).

### 4.2 CyTOF-Methode und Optimierungsstrategien

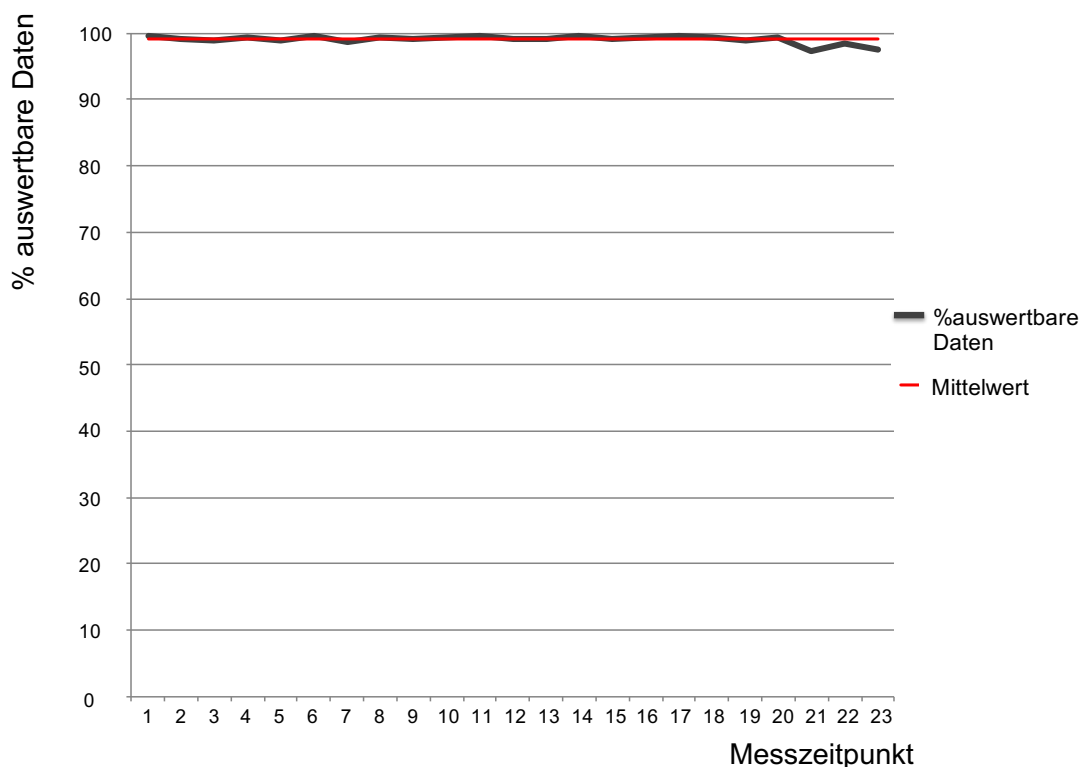
In der vorliegenden Untersuchung wurde die neue Technologie der Massenzytometrie als Methode zur Messung von Zellen im Vollblut von AD-Patienten verwendet. Für eine genaue Interpretation der biologischen Unterschiede zwischen den Proben wurden Variationen in der Probenaufbereitung und bei der Messung in dieser Untersuchung durch das sog. Barcoding von Proben und durch die Normalisierung des endgültigen Datensatzes minimiert.



Beim Barcoding wurden in dieser Untersuchung drei Patientenproben pro Messtag mithilfe spezieller Antikörper spezifisch markiert. Die Proben wurden nach dem Barcoding zusammengeführt und in einem Ansatz prozessiert. Anschließend wurden sie anhand des verwendeten spezifischen Barcodes wieder entschlüsselt.

So konnten bspw. Schwankungen innerhalb eines Messtages bedingt durch unterschiedliche Laborbedingungen verringert werden. Vor Beginn der Messungen an Patienten wurden Versuche durchgeführt, um die Funktion und Belastbarkeit des Barcodings zu testen und dieses zu etablieren.

Zur Qualitätskontrolle des Barcodings wurde der Anteil der auswertbaren Zellen an DNA-positiven, lebenden Einzelzellen nach Beadausschluss berechnet (sog. Cell Recovery). Hierzu wurden die Zellzahlen der Leukozyten (CD45-Färbung) von Donor 1, 2 und 3 addiert und durch die Zahl aller Leukozyten (nach Beadausschluss) dividiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.



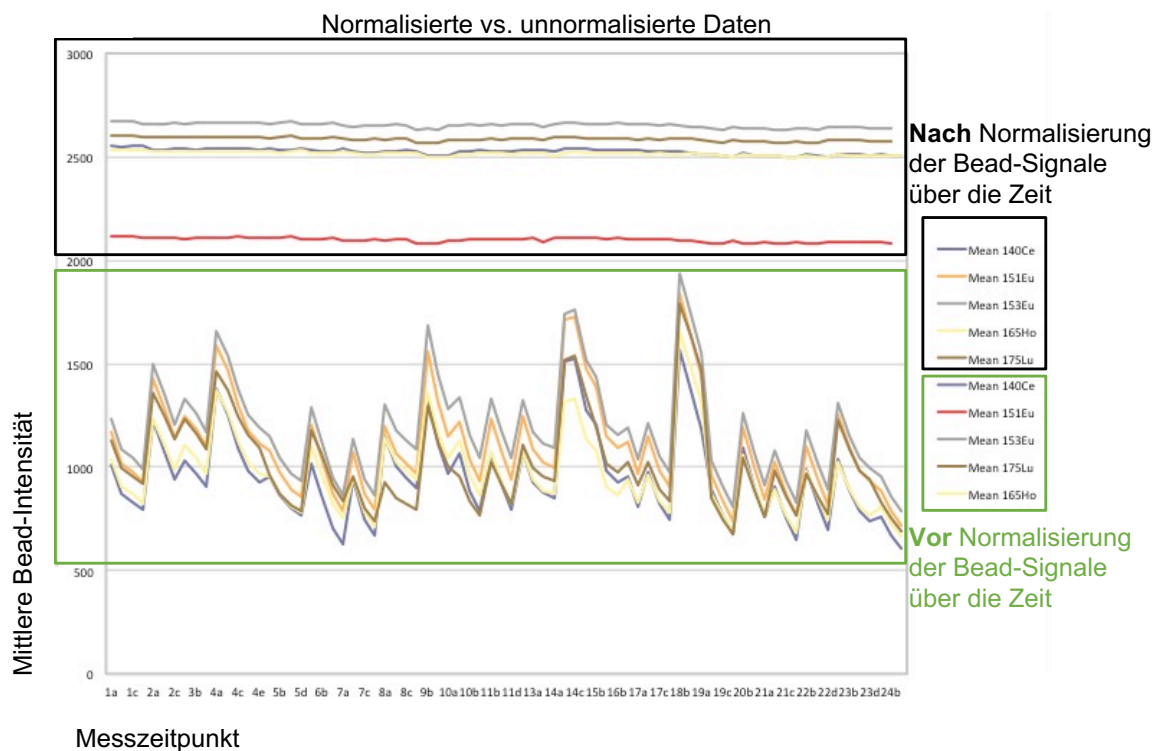
**Abbildung 13: Auswertung zur Datenrückgewinnung bei Verwendung des CD45-Barcodings.**

Über den Messzeitraum vergleichbare Qualität. Dargestellt ist der Anteil der auswertbaren Datenpunkte (Summe der Leukozyten, Donor 1-3) von der Anzahl der Zellen nach Vorgating (Zellen nach Ausschluss der Doubletten, der toten Zellen und der Beads, s.u.) über die Zeit sowie der Mittelwert. Die einzelnen Messpunkte wurden durch eine Linie miteinander verbunden.

An jedem Messtag konnten mehr als 97 % der gemessenen Zellen den einzelnen Donoren wieder zugeordnet werden. Die Daten schwankten um den Mittelwert von 99,1 %.

Damit ist die Zellzuordnung zu den Donoren durchgängig sehr hoch (max. Zellverlust von -3 % der Zellen pro Messtag).

Weiterhin kann es durch Veränderungen am Gerät (bspw. lange Messzeiten, Spülen) zu Schwankungen in der Geräteleistung kommen. Diese können durch eine Normalisierung der Daten verringert werden. Hierfür werden jeder Probe vor der Messung Beads zugefügt, die unterschiedliche Metallisotopen (z.B. 140 Cerium, 151 Europium) beinhalten. Die Signale dieser Elemente in allen Messungen werden im Anschluss unter Verwendung eines Algorithmus verrechnet und dazu genutzt, die Daten gegen einen Standard zu normalisieren. In Abbildung 14 sind die nicht-normalisierten gegen die normalisierten Daten dargestellt.



**Abbildung 14: Normalisierung der CyTOF-Daten.**

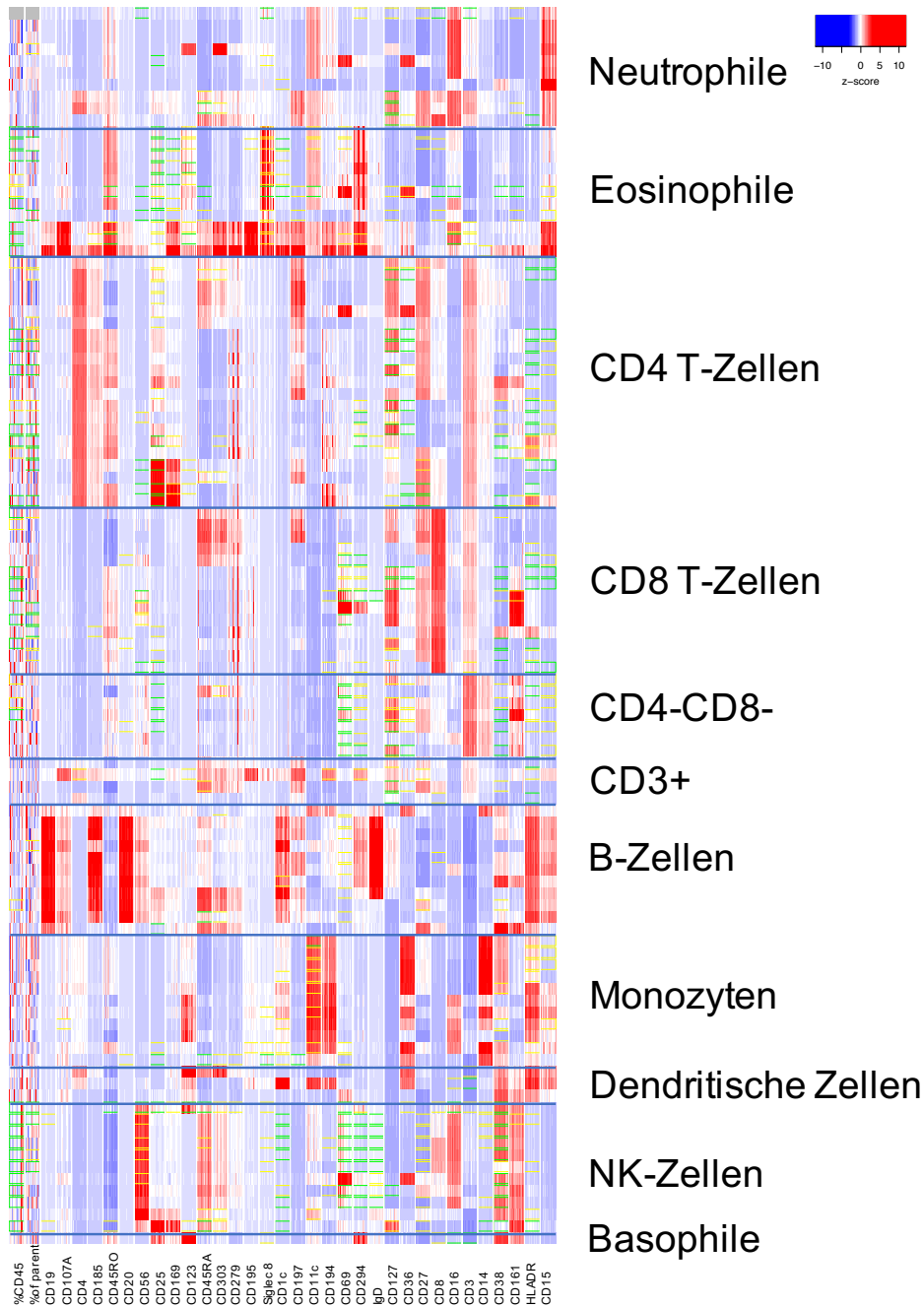
Die erhobenen CyTOF-Daten wurden mithilfe der Helios-Software normalisiert. Dargestellt ist die mittlere Intensität einzelner Elemente. Die über den Messzeitraum entstandenen Schwankungen in der mittleren Intensität waren nach Normalisierung der Daten deutlich geringer.

Die nicht-normalisierten Daten sind im unteren Bereich der Abbildung 14 zu sehen. Die mittleren Bead-Intensitäten schwanken zwischen den Messtagen deutlich. Die mittleren

Intensitätswerte der Farbstoffe wurden als einzelne Punkte abgebildet und durch eine Linie miteinander verbunden. Nach Durchführung einer Normalisierung mithilfe eines Algorithmus sind die mittleren Bead-Intensitäten deutlich konstanter. Die Daten sind hinweisend auf einen Ausgleich der technischen Schwankungen. Biologische bedingte Unterschiede zwischen den Proben konnten dadurch besser beurteilt werden.

### **4.3 Zellanalyse**

Zur Auswertung der Daten wurde zunächst eine nicht-supervidierte Analyse, eine FlowSOM-Analyse, durchgeführt (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik). Diese ermöglicht eine feine Auflösung der Zellsubsets und macht Unterschiede in Zellpopulationen zwischen den Gruppen sichtbar. Die Daten sind in Abbildung 15 in Form einer Heatmap dargestellt. Es wurden Unterschiede in Leukozytenpopulationen zwischen den Untersuchungsgruppen besonders bei Eosinophilen, T-Zellen und NK-Zellen gefunden.



**Abbildung 15: Nicht-supervidierte Cluster-Analyse von Blutimmunzellen bei AD.**

Mittels FlowSOM-Algorithmus wurden alle bekannten Leukozytenpopulationen untersucht. Eine Cluster-Analyse wurde durchgeführt und die Cluster manuell sortiert. In Zeilen dargestellt sind die durch Oberflächenmolekülexpression charakterisierten Populationen der entsprechenden Zellarten. In Spalten finden sich die Frequenzen und mittleren Signalintensitäten der gefärbten Oberflächenmarker auf Zellen von ADs-, ADm-Patienten und Kontrollpersonen (pro Kasten von links nach rechts, je n=20). Statistische Auswertung zwischen ADs und Gesunden: grüner Kasten:  $P < 0,01$ ; gelber Kasten:  $P < 0,05$ .

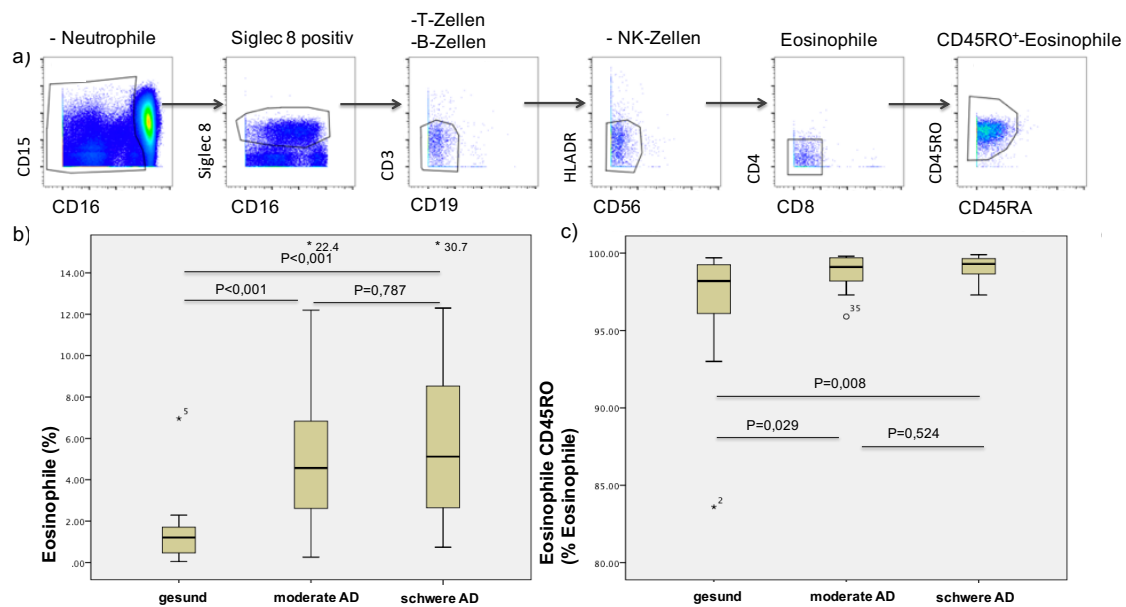
Der Fokus der Datenauswertung lag hier auf der manuellen Analyse der Daten. Mit dieser konnten zum einen aus der Literatur bekannte Zellpopulationen untersucht werden. Zum

anderen konnten Ergebnisse der nicht-supervidierten Analyse verifiziert werden. Die Ergebnisse dieser manuellen Analyse sind im Folgenden gezeigt.

### 4.3.1 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile sind myeloide Zellen, die im Blut und in der Haut von AD-Patienten mit erhöhter Frequenz nachweisbar sind. Im Rahmen dieser Untersuchung entsprachen die Eosinophilenfrequenzen primär einer Positivkontrolle der CyTOF-Methode. Darüber hinaus wurden die Zellen näher charakterisiert.

Nach durchgeführtem Vorgating (s. Kapitel 3.2.3) erfolgte die Identifikation der Eosinophilen durch Ausschluss von T- (CD3<sup>+</sup>) und B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>), Neutrophilen (CD16<sup>+</sup>) und NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>) sowie positiver Selektion des Oberflächenrezeptors Siglec 8 (sialic acid-binding Ig-like lectin) (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Erhöhte Eosinophilenfrequenz im Blut von Patienten mit AD.**

Quantitative und qualitative Untersuchung von Eosinophilen im Blut von AD-Patienten und Gesunden a) Identifikation von Eosinophilen. Aus CD45<sup>+</sup>-Zellen wurden T- (CD3<sup>+</sup>) und B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) ausgeschlossen und nach Exklusion der Neutrophilen (CD16<sup>+</sup>) Eosinophile Granulozyten mit dem Marker Siglec 8 identifiziert. b) Statistische Auswertung. Die Eosinophilenfrequenz war bei AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht. Es gab keinen Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. c) Bei CD45RO<sup>+</sup>-Eosinophilen war bei AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden ein Trend zu erhöhten Frequenzen festzustellen. Sternchen mit Wert (\*) zeigt Wert außerhalb Skala. (%: bezogen auf CD45<sup>+</sup>-Zellen)

Die mediane Eosinophilenfrequenz im peripheren Blut betrug in der Kontrollgruppe 1,2 % (IQR: 0,4-1,7 %) und war entsprechend in beiden Patientengruppen im Vergleich

erhöht (ADm: 3,8-fach; ADs: 4,3-fach). Zwischen den Patientengruppen war sie vergleichbar ( $P=0,787$ ).

Die Frequenz der Eosinophilen war unabhängig vom Schweregrad (SCORAD) der Erkrankung ( $R^2=0,002$ ).

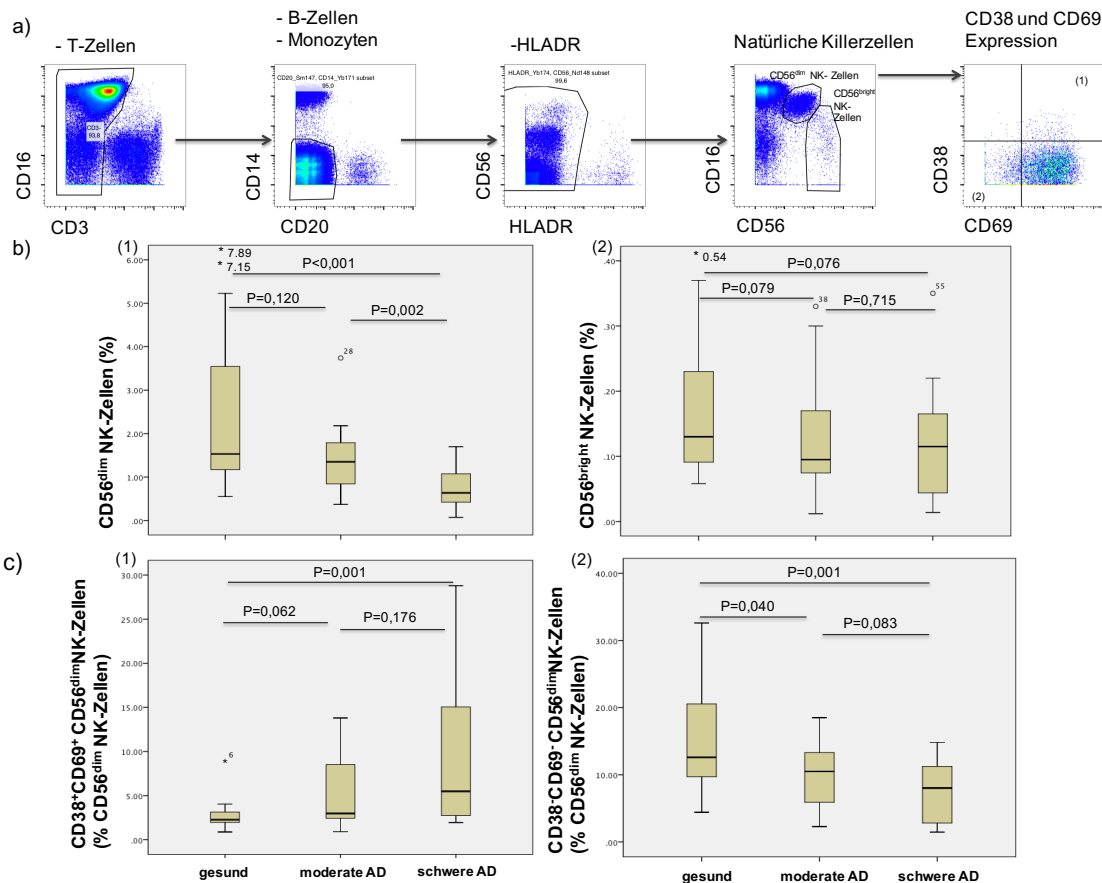
In der nicht-supervidierten Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) wurde CD45RO als für die AD charakteristischer Marker identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestätigung mittels manueller Analyse.

Die Mehrheit der Eosinophilen exprimiert in allen drei Untersuchungsgruppen CD45RO (Mediane  $>98\%$ ). Im Blut der Patienten war bei CD45RO<sup>+</sup>-Eosinophilen bei AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden ein Trend zu höheren Frequenzen zu erkennen ( $P=0,008$ ). Dabei war der Interquartilabstand bei Gesunden mit  $3,4\%$  (IQR  $95,9-99,3\%$ ) im Vergleich zu  $1,5\%$  bei ADm- und  $1,1\%$  bei ADs-Patienten fast 3-fach größer. In beiden Patientengruppen waren die Frequenzen der CD45RO<sup>+</sup>-Eosinophilen vergleichbar (s. Abbildung 16c). Der geringe Unterschied in den Frequenzen und die kleine Fallzahl müssen in der Beurteilung der Ergebnisse beachtet werden. Zudem zeigte die Untersuchung der Signalstärke von CD45RO auf Eosinophilen keine Unterschiede zwischen den Gruppen ( $P=0,298-0,715$ ; Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend fand sich im Blut eine erhöhte Frequenz der Eosinophilen bei AD-Patienten verglichen mit Gesunden, die mehrheitlich CD45RO auf der Oberfläche exprimierten.

#### **4.3.2 NK-Zellen**

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zählen zum angeborenen Immunsystem, sind für zytotoxische Wirkungen bekannt und wurden zuvor als für die AD pathogenetisch relevant diskutiert (78; 79). Nach Ausschluss anderer Zellpopulationen wurden die NK-Zellen als CD56 und CD16 positiv identifiziert (s. Abbildung 17a).



**Abbildung 17: Erniedrigte Frequenzen von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen im Blut von Patienten mit AD und Expression von CD38 und CD69.**

Qualitative und quantitative Untersuchung von NK-Zellen im Blut von AD-Patienten und Gesunden  
a) Identifikation von CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> und CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Zunächst wurden T-(CD3) und B-(CD20) Lymphozyten, Monozyten sowie HLADR<sup>+</sup>-Zellen ausgeschlossen. Über CD56 wurden die NK-Zellen in die beiden Populationen CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> unterschieden. b) Statistische Auswertung der NK-Zellfrequenzen. (1) ADs-Patienten wiesen eine niedrigere Frequenz der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen auf. (2) Die Frequenzen der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen waren vergleichbar. Sternchen mit Wert (\*) zeigt Wert außerhalb Skala. c) Untersuchung der Marker CD38 und CD69 auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen im Blut von AD-Patienten und Gesunden (1/2) Statistische Auswertung. Die CD38 CD69 doppelpositive CD56<sup>dim</sup>NK-Zellfrequenz war bei ADs-Patienten erhöht. Im Gegensatz dazu war bei den CD38 CD69-doppelnegativen CD56<sup>dim</sup>NK-Zellen ein Trend zu geringeren Frequenzen im Blut von ADs-Patienten im Vergleich zu Gesunden zu erkennen. (%: bezogen auf CD45<sup>+</sup>-Zellen)

Die häufigste NK-Zellpopulation benannt nach CD56<sup>dim</sup> und durch CD16 Oberflächenexpression charakterisiert, vermittelt in vivo zytotoxische Funktionen. Die mediane Frequenz der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen war im Blut von Patienten mit schwerer AD im Vergleich zu nicht-atopischen Kontrollen 2,4-fach geringer. Bei ADm-Patienten war sie 2,1-fach höher als bei ADs-Patienten. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine relativ große Streuung der Werte (IQR 1,13-3,55; s. Abbildung 17b).

Die medianen Frequenzen von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die für die Produktion von Zytokinen bekannt sind, waren zwischen den drei Untersuchungsgruppen vergleichbar, bei insgesamt sehr geringer Frequenz und auffällig großer Streubreite (IQR 0,067- 0,146 %; s. Abbildung 17b).

Die multiparametrische Untersuchungsmethode erlaubte die Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich unterschiedlicher Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. In der nicht-supervidierten Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) war insbesondere die Expression der Zellmarker CD38 und CD69 auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen auffällig.

Für die Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die unabhängige Analysestrategie mittels direktem Gating (FlowJo) genutzt (s. Abbildung 17). Die Frequenzen wurden auf die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellpopulation bezogen.

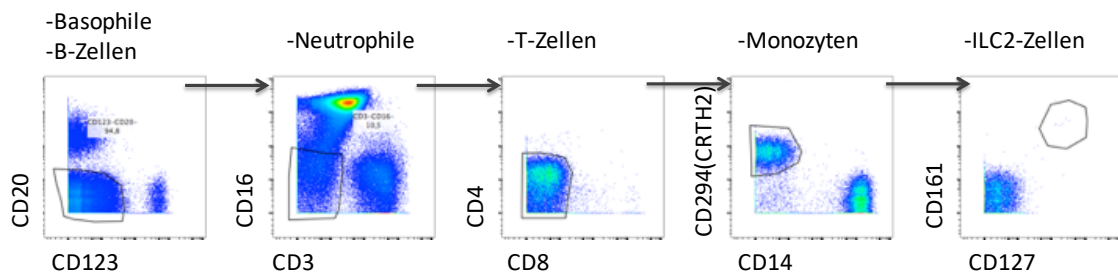
Die mediane Frequenz der CD38CD69-doppelpositiven CD56<sup>dim</sup>NK-Zellen war bei ADs-Patienten 2,4-fach höher als bei Gesunden (s. Abbildung 17c). Der IQR bei ADs-Patienten war mit 12,6 % im Vergleich zu Gesunden mit 1,28 % 9,8-fach erhöht. Bei ADm-Patienten und Gesunden waren die medianen Frequenzen vergleichbar (P=0,062). Entsprechend war die CD38CD69-doppelnegative Population bei nicht-atopischen Probanden größer als bei AD-Patienten. Hier zeigte sich auch zwischen der ADm- und Kontrollgruppe eine um 16,7 % verringerte Frequenz (P=0,040; s. Abbildung 17c). Allerdings muss auch hier der bei kleiner Fallzahl geringe Unterschied zwischen den medianen Frequenzen bei der Interpretation berücksichtigt werden.

### **4.3.3 Innate lymphoid cells 2 (ILC2s)**

In der Haut von AD-Patienten wurden erhöhte Frequenzen der seltenen angeborenen lymphoiden Zellen der Gruppe 2 (ILC2s) gefunden, deren funktionelle Rolle bisher nicht geklärt ist (43). In dieser Untersuchung konnten die ILC2s auch im Blut identifiziert werden.

ILC2s sind definiert als CRTH2, CD127 (IL-7R) und CD161 positive sowie Zelllinienmarker-negative Zellpopulation (Lineage-Marker negativ: CD123 Basophile Granulozyten; CD20 B-Zellen; CD3 T-Zellen; CD16 Neutrophile Granulozyten; CD4 CD8 T-Zellen; CD14 Monozyten; s. Abbildung 18) (40).





**Abbildung 18: Identifikation von ILC2s.**

Untersuchung von ILC2s im Blut von AD-Patienten und Gesunden a) Identifikation der ILC2s. Nach Ausschluss von Basophilen (CD123), Neutrophilen (CD16), B- (CD20), T-Zellen (CD19) und Monozyten (CD14) wurden CD294 (CRTH2), CD161 und CD127 positive Zellen als ILC2s identifiziert.

Es wurde eine geringe Zellzahl der ILC2s im Blut der Probanden gemessen (mediane Frequenz Gesund: 0,00365 %; <20 Zellen pro Donor). Aufgrund der sehr niedrigen Frequenzen wurde kein Vergleich zwischen den Gruppen durchgeführt.

#### 4.3.4 T-Zellen

Während in den großen T-Zellpopulationen (CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Zellen) in dieser Untersuchung geringe Unterschiede in den Frequenzen zwischen ADs-Patienten und Gesunden gemessen wurden, zeigten sich in deren Subpopulationen, wie Gedächtniszellen und Tregs, deutliche Veränderungen.

Die T-Zellen wurden mithilfe der für sie charakteristischen Expression des Markers CD3 identifiziert. Daneben wurden für jede Subpopulation spezifische Marker zur Identifikation genutzt. Es fiel eine geringe Einstrahlung des CD16 (169 Thulium)- in den CD3 (170 Erbium)-Massenkanal auf. In Abbildung 19a ist die Strategie zur Identifikation der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Populationen sowie CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen dargestellt.

Bei ADs-Patienten war die Frequenz der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Probanden um ca. 27,6% verringert. In der ADm-Patientengruppe wurden vergleichbare T-Zellfrequenzen gemessen. Die Daten wiesen eine relativ große Streuung auf (IQR 5,7-10,9 %; s. Tabelle 6).

Die mediane Frequenz der T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) war innerhalb der T-Zellen bei ADs-Patienten um 10,4 % im Vergleich zu Gesunden erhöht. Der Anteil der zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) war um 16,5 % verringert. Auch innerhalb der Leukozyten war die Frequenz der CD8<sup>+</sup>-Zellen im Blut bei ADs-Patienten um ca. ein Drittel geringer. Die Ratio CD4:CD8 war vergleichbar (P=0,062).

**Tabelle 6: T-Zellfrequenzen im Blut von AD-Patienten und Gesunden.**

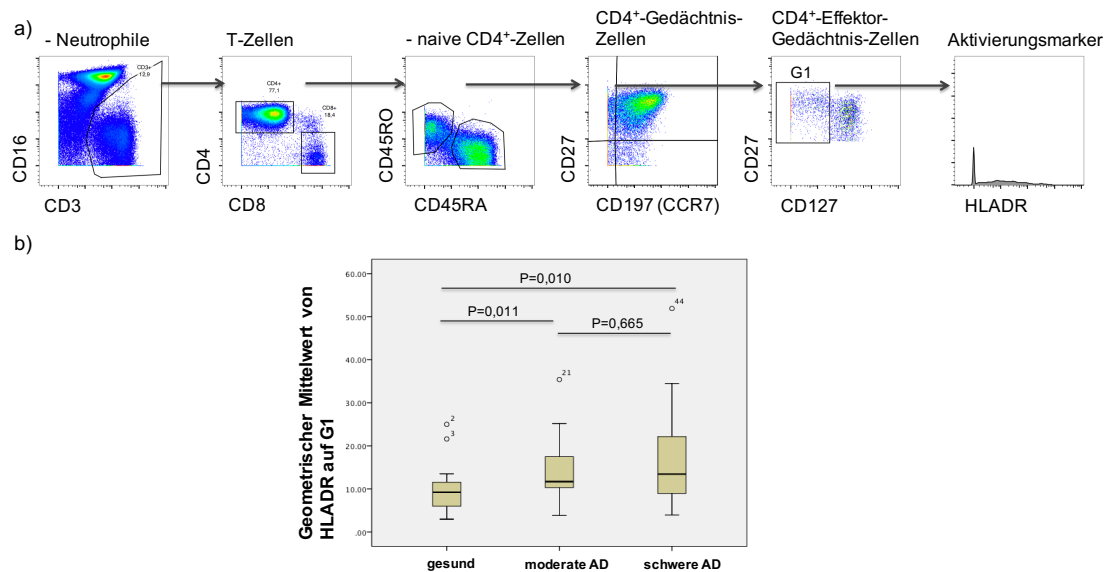
Zellpopulation	Gesund (0)	Moderate AD (1)	P-Wert (0-1)	Schwere AD (2)	P-Wert (0-2)	P-Wert (1-2)
CD3 <sup>+</sup> -Zellen (%)	14,5 (9,7-20,6)	11,0 (9,2-14,9)	0,133	10,5 (7,3-14,4)	<b>0,034</b>	0,457
CD4 <sup>+</sup> -Zellen (%)	9,5 (6,3-12,6)	7,1 (5,7-9,0)	0,091	6,9(5,2-10,9)	0,096	0,925
CD4 <sup>+</sup> -Zellen (% CD3 <sup>+</sup> )	62,7±8,2	63,8±9,5	0,712	69,2±10,5	<b>0,035</b>	0,093
naive CD4 <sup>+</sup> -Zellen (%)	4,8 (3,1-7,7)	3,985(3,1 -5,6)	0,512	5,1(2,7-6,9)	0,957	0,534
naive CD4 <sup>+</sup> -Zellen (% CD4 <sup>+</sup> )	57,3 (41,3-61,6)	58,7(49,5-68,5)	0,239	64,0(54,2-70,5)	0,066	0,433
CD4 <sup>+</sup> -Gedächtnis-Zellen (%)	3,6 (2,8-4,5)	2,2 (1,7-3,2)	<b>0,016</b>	2,1(1,4-3,3)	<b>0,002</b>	0,441
CD4 <sup>+</sup> -Gedächtnis-Zellen (% CD4 <sup>+</sup> )	36,7 (30,6-52,3)	33,4 (24,3-42,5)	0,133	29,9(23,4-37,6)	<b>0,040</b>	0,473
CD8 <sup>+</sup> -Zellen (%)	3,9 (2,4-5,1)	3,0 (2,2-3,9)	0,152	2,4(1,4-3,3)	<b>0,005</b>	0,148
CD8 <sup>+</sup> -Zellen (% CD3 <sup>+</sup> )	26,1±6,6	25,5±5,9	0,769	21,8±6,1	<b>0,044</b>	0,064
CD8 <sup>+</sup> -Gedächtnis-Zellen (% CD8 <sup>+</sup> )	26,6 (21,2-34,0)	20,4 (15,2-35,1)	0,337	19,4 (14,2-28,9)	0,130	0,617
CD8 <sup>+</sup> -Gedächtnis-Zellen (%)	0,80 (0,63-1,22)	0,82 (0,30-1,23)	0,351	0,53 (0,19-0,65)	<b>0,001</b>	<b>0,047</b>

T-Zellen: CD3<sup>+</sup>-Zellen; Naive CD4<sup>+</sup>-Zellen: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>-Gedächtnis-Zellen: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>-Gedächtnis-Zellen: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>; (%: bezogen auf CD45<sup>+</sup>-Zellen)

Bei Untersuchung der naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) zeigten sich vergleichbare Frequenzen (s. Tabelle 6). Auch die naiven CD8<sup>+</sup>-Zellfrequenzen (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) waren in allen Untersuchungsgruppen vergleichbar (P >0,05; Daten nicht dargestellt). Die Ratio der zytotoxischen CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen war zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich (P >0,05; Daten nicht dargestellt). Auch in weiteren untersuchten Subpopulationen der CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zellfrequenzen im Blut (Daten nicht dargestellt).

Bezogen auf die Leukozytengesamtzahl (CD45<sup>+</sup>) zeigte die Messung der CD45RO<sup>+</sup>-Gedächtniszellen in der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation eine um ca. ein Drittel verringerte Frequenz bei ADs-Patienten im Vergleich zu Gesunden (s. Tabelle 6). Die CD4<sup>+</sup>-Gedächtnis-Zellfrequenzen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) waren in der ADs-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb der Leukozyten (CD45<sup>+</sup>) um 41,7 % verringert (P=0,002). In der ADm-Patientengruppe betrug die Frequenzabnahme im Vergleich zu Gesunden 38,9 % (P=0,016). Allerdings war die Streuung der Ergebnisse groß (s. Tabelle 6).

Bezogen auf die CD4<sup>+</sup>-(T-Helfer-)Zellen zeigte sich bei den CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellfrequenzen in der ADs-Gruppe eine Abnahme von 18,5 % im Vergleich zu Gesunden (P=0,040; s. Tabelle 6).



**Abbildung 19: T-Zellidentifikation und erhöhte HLADR-Signalstärke einer Subpopulation bei Patienten mit atopischer Dermatitis.**

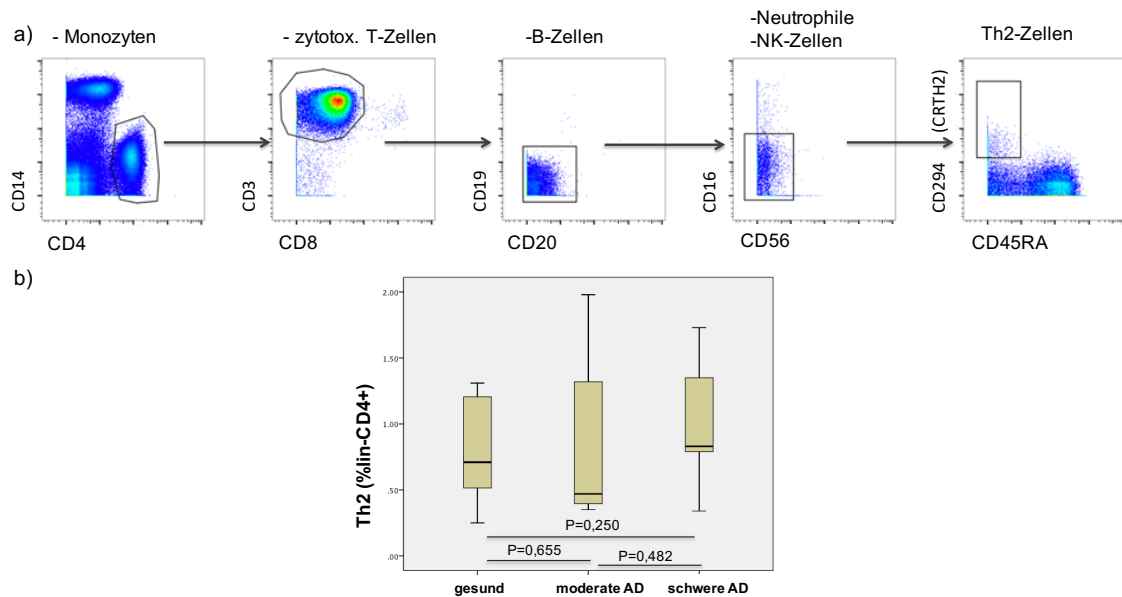
Quantitative und qualitative Untersuchung von T-Zellen im Blut von AD-Patienten und Gesunden a) Strategie zur Identifikation einzelner T-Zellpopulationen. Zunächst wurden Neutrophile (CD16) ausgeschlossen und CD3<sup>+</sup>-Zellen als T-Zellen identifiziert. Innerhalb der T-Zellen wurden die T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) definiert. Mithilfe von CD45RO und CD45RA konnte zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen unterschieden werden. Innerhalb der CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen wurden Differenzierungsstufen mithilfe der Marker CD27 und CD197 (CCR7) eingeteilt. Auf CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>-Zellen wurde CD127 ausgeschlossen und die Signalstärke von HLADR auf diesen Zellen bestimmt. b) Vermehrte Expressionsstärke des Aktivierungsmarkers HLADR auf einer CD4<sup>+</sup>-Effektor-Gedächtniszellsubpopulation (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>).

Bei der nicht-supervidierten Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) der Daten zeigten sich Auffälligkeiten in einer Untergruppe der CD4<sup>+</sup>-Effektor-Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>). Mittels manueller Gatingstrategie wurden diese Zellen identifiziert und mithilfe der Marker CD27, einem Korezeptor, und CCR7 in Subpopulationen unterteilt.

Auf der CD4<sup>+</sup>-Effektor-Gedächtniszellpopulation CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup> wurde die Expressionsstärke des Aktivierungsmarkers HLADR (geometrisches Mittel oder geometric mean) bestimmt. Die Signalstärke von HLADR war in den Patientengruppen um das 1,3- (ADm-Gruppe) bzw. 1,5-fache (ADs-Gruppe) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Zwischen den beiden Patientengruppen waren die Expressionslevel vergleichbar (P=0,665; s. Abbildung 19b).

Im Folgenden werden besondere Untergruppen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beschrieben, die in der Literatur im Zusammenhang mit der AD diskutiert werden.

Eine Untergruppe sind die Typ 2 T-Helferzellen (Th2-Zellen). Zur Identifikation dieser wurde deren Expression von CRTH2 und CD4 verwendet sowie CD45RA und Zelllinienmarker (Lin<sup>-</sup> mit Lineage-Marker CD19, CD20 B-Zellen, CD56 NK-Zellen, CD16 Neutrophile Granulozyten) ausgeschlossen (s. Abbildung 20).

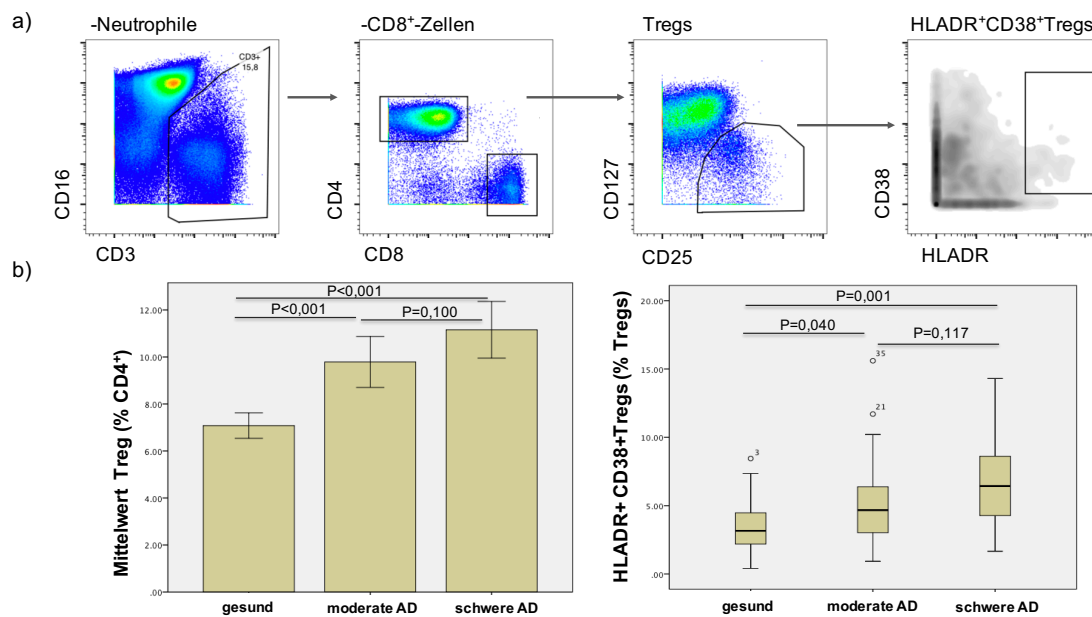


**Abbildung 20: Th2-Zellen im Blut von AD-Patienten und Gesunden.**

a) Identifikation von Th2-Zellen im peripheren Blut. Nach Ausschluss von sog. Zelllineage-Markern (Monozyten (CD14), zytotoxische T-Zellen (CD8), B-Zellen (CD19, CD20), Neutrophile (CD16), NK-Zellen (CD56)), wurden die Th2-Zellen als CD294<sup>+</sup> (CRTH2) und CD45RA<sup>-</sup> Zellen identifiziert. b) Statistische Auswertung der Th2-Frequenzen (bezogen auf CD4<sup>+</sup>) in den drei Gruppen bei n=7 Patienten.

Der Median der Th2-Zellfrequenz in der Gruppe der ADs-Patienten war mit 0,83 % etwas höher als bei den Gesunden (0,71 %), aber dennoch vergleichbar. Die mediane Frequenz in der ADm-Gruppe betrug dagegen 0,47 % (s. Abbildung 20). Diese Daten beziehen sich auf eine Stichprobengröße von n=21 (n=7 pro Gruppe). Eine Gruppengrößenberechnung zur Identifikation von Gruppenunterschieden (Alpha-Wert 0,05; Teststärke 80 %) lieferte eine benötigte Gesamtpatientenzahl von 64 ADs- bzw. 507 ADm-Patienten bei einer jeweils gleich großen Kontrollgruppe.

Ferner wurden innerhalb der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die regulatorischen T-Zellen (Tregs) identifiziert. Sie sind charakterisiert durch CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> (s. Abbildung 21a) (72).



**Abbildung 21: Identifikation von regulatorischen T-Zellen (Tregs).**

Quantitative und qualitative Untersuchung von Tregs. Zunächst wurden T-Zellen bestimmt und in CD4 und CD8 positive Zellen unterteilt. Anschließend wurden die Tregs ( $CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ ) identifiziert. Auf diesen Zellen wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLADR bestimmt.

Der Anteil der Tregs an  $CD4^+$ -Zellen war sowohl bei ADs-Patienten als auch bei ADm-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 1,58- bzw. 1,38-fache erhöht (s. Abbildung 21b).

Bezogen auf die Frequenzen der gesamten Leukozyten ( $CD45^+$ ) waren die Treg-Frequenzen in den drei Untersuchungsgruppen vergleichbar (s. Tabelle 7).

**Tabelle 7: Frequenzen der regulatorischen T-Zellen bezogen auf Leukozyten.**

Zellpopulation	Gesund (0)	Moderate AD (1)	P-Wert (0-1)	Schwere AD (2)	P-Wert (0-2)	P-Wert (1-2)
Treg (%)	0,6 (0,5-0,9)	0,7 (0,5-0,9)	0,516	0,8 (0,5-1,0)	0,239	0,607
HLADR <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> Treg (%)	0,019 (0,013-0,027)	0,033 (0,024-0,048)	<b>0,010</b>	0,047 (0,027-0,064)	<b>&lt;0,001</b>	0,110

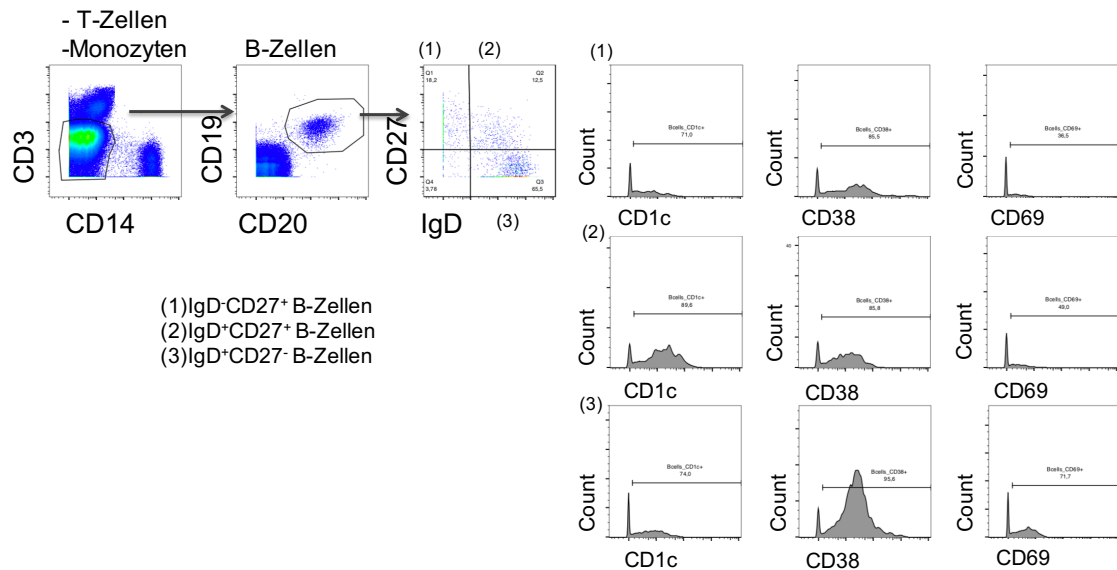
Nach auffälligen Ergebnissen in der nicht-supervidierten Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) wurde auf den Tregs die simultane Expression von CD38 und HLADR detailliert mittels manueller Gatingstrategie untersucht (s. Abbildung 21). In der ADs-Gruppe war die Expression der beiden Marker auf Tregs (bezogen auf Tregs) doppelt so häufig wie bei Gesunden ( $P=0,001$ ). Auch in der ADm-Gruppe war die Frequenz der  $CD38^+HLADR^+$  Tregs 1,47-fach höher als in

der Kontrollgruppe (P=0,040; s. Abbildung 21b). Bezogen auf die Leukozytenzahl war die Frequenz der HLADR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Tregs in beiden Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe 1,74 (ADm)- bis 2,47 (ADs)-fach höher (s. Tabelle 7).

Zusammenfassend zeigten sich verringerte T-Zellfrequenzen bei ADs-Patienten im Vergleich zu Gesunden. Verschiebungen innerhalb der T-Zellen wie eine Zunahme des CD4<sup>+</sup>-Zellanteils und eine Abnahme des CD8<sup>+</sup>-Zellanteils waren zu beobachten. Außerdem waren Gedächtniszellfrequenzen bei ADs-Patienten verglichen mit Kontrollpersonen geringer. Die Th2-Zellfrequenzen waren vergleichbar. Der Anteil der Tregs innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen und der Anteil aktivierter Tregs, charakterisiert durch Expression von CD38 und HLADR, waren erhöht.

#### 4.3.5 B-Zellen und weitere Leukozyten

B-Zellen wurden mithilfe von CD19 und CD20 identifiziert. CD20 wird nicht auf Antikörper-produzierenden Plasmazellen exprimiert, sodass diese ausgeschlossen wurden. Mit CD27 und IgD wurde die B-Zellpopulation in ihre Untergruppen (klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), nicht-klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), naive B-Zellen (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>)) eingeteilt (s. Abbildung 22).



**Abbildung 22: Identifikation von B-Zellpopulationen.**

Identifikation von B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>B-Zellen und naiven B-Zellen (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>). Zunächst wurden Monozyten (CD14) und T-Zellen (CD3) ausgeschlossen. Mithilfe von CD20 und CD19 wurden B-Zellen identifiziert. Diese wurden mittels IgD- und CD27-Expression in Subpopulationen unterteilt. Auf diesen wurden jeweils die Marker CD1c, CD38 und CD69 untersucht.

Die Frequenzen der untersuchten B-Zellpopulationen waren in den drei Gruppen vergleichbar (s. Tabelle 8). Auch die Frequenz der die Aktivierungsmarker CD38 und CD69 sowie CD1c exprimierenden Zellen war nicht unterschiedlich ( $P=0,091-1,000$ ). Nur zwischen ADs-Patienten und Gesunden zeigte sich ein leichter Trend zu erhöhten Frequenzen von CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen ( $P=0,048$ ). Eine Analyse der Expressionsstärke von CD38 auf diesen Zellen zeigte keine Unterschiede ( $P>0,05$ ; Daten nicht dargestellt).

**Tabelle 8: Vergleichbare Frequenzen von B-Zellpopulationen im Blut von AD-Patienten und Gesunden.**

Zellpopulation	Gesund (0)	Moderate AD (1)	P-Wert (0-1)	Schwere AD (2)	P-Wert (0-2)	P-Wert (1-2)
B-Zellen (%)	2,6 (2,0-3,2)	2,2 (1,3-2,7)	0,102	1,7 (1,3-3,8)	0,152	0,787
IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	14,8±4,6	14,9±7,9	0,978	12,4±5,5	0,142	0,257
CD1c <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	10,2±3,2	9,7±5,1	0,714	8,4±3,8	0,125	0,390
CD38 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	11,8±3,9	11,3±5,8	0,740	9,3±3,9	0,048	0,208
CD69 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	3,5 (2,7-5,4)	3,8 (2,5-4,9)	0,860	3,4 (2,5-4,7)	0,465	0,589
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	14,1 (8,7-16,8)	11,0 (8,1-16,4)	0,256	11,3 (7,2-17,2)	0,372	0,735
CD1c <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	12,0 (7,8-14,6)	9,1 (7,0-14,2)	0,234	10,1 (6,2-16,2)	0,402	0,705
CD38 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	10,3 (6,7-11,7)	7,7 (5,9-10,8)	0,156	7,2 (5,0-10,8)	0,218	0,808
CD69 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	5,0 (3,7-6,4)	4,7 (3,6-6,7)	0,766	4,6 (3,5-7,7)	0,829	1,000
IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	68,5±7,9	69,3±14,4	0,834	71,2±13,3	0,453	0,676
CD1c <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	49,3±7,8	49,9±12,4	0,857	53,3±12,7	0,237	0,396
CD38 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	65,1±8,0	64,2±15,6	0,827	66,4±14,6	0,730	0,653
CD69 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> B-Zellen (% B-Zellen)	39,2±8,0	41,5±10,3	0,424	45,0±12,8	0,091	0,348

Dargestellt sind die Subpopulationen der B-Zellen mit deren Frequenzen und der statistischen Auswertung. Median (IQR) mit Mann-Whitney-U-Test und Mittelwert±SD mit T-Test. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. (%: bezogen auf CD45<sup>+</sup>-Zellen)

In exemplarischen Untersuchungen sowie nicht-supervidierter Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) wurden die in Abbildung 3 dargestellten weiteren Leukozyten untersucht. Es wurden keine Auffälligkeiten in diesen Zellpopulationen gefunden.

## **5 Diskussion**

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde erstmals mittels CyTOF-Technologie eine hochauflösende Analyse aller bekannten Leukozytenpopulationen bei AD-Patienten und Gesunden im Blut durchgeführt. Ziel war die Überprüfung, ob sich auf zellulärer Ebene Phänotypen identifizieren lassen, die Hinweise auf ein krankheitsspezifisches Entzündungsgeschehen geben. In der Konsequenz wäre die Entwicklung eines besseren Krankheitsverständnisses, neuer Verlaufparameter im Blut zur objektiven Bestimmung der Krankheitsaktivität und neuer individueller Therapien möglich. Hierzu wurde die Massenzytometrie genutzt, die die Phänotypisierung vieler verschiedener Zellsubsets gleichzeitig ermöglicht. Es wurden massenzytometrisch 35 Parameter auf Einzelzellebene untersucht. Aktuell verfügbare Verfahren zur technischen Fehlerminimierung wie Barcoding und Normalisierung wurden angewandt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit voneinander unabhängigen Methoden. Dadurch wurden die Ergebnisse gleichzeitig verifiziert.

Es wurden zum einen bereits bekannte Unterschiede reproduziert, zum anderen bisher nicht bekannte Veränderungen in Zellpopulationen wie NK-Zell- und T-Zellsubpopulationen gefunden. Die Untersuchung bildet eine Grundlage für methodische Verbesserung und gibt Anstoß für weitere Forschung im Hinblick auf die identifizierten Subpopulationen.

### **5.1 Patientengut**

Die Alters- und Geschlechtsverteilung zwischen den drei Untersuchungsgruppen war vergleichbar. Wenn auch bei einer Gruppengröße von  $n=20$  ein unbekanntes Bias nicht ausgeschlossen werden kann, so deuten die Daten doch darauf hin, dass die Gruppenunterschiede durch die Erkrankung bedingt sind. Diese Annahme wird durch die stringenten Einschlusskriterien (extrinsische AD, Gesamt-IgE  $>100$  kU/l, Polysensibilisierung) und Feststellen von teilweise graduellen Unterschieden unterstützt.

### **5.2 Technische Optimierungsstrategien**

Neben den Kriterien zur Kollektivauswahl wurden vor Beginn der Untersuchung auch Überlegungen zum Versuchsaufbau getroffen. Grundsätzlich sollte Vollblut verwendet



werden, damit kein Bias durch Vorselektion der Zellpopulationen entsteht. Denn andere Gruppen nutzen für ihre Untersuchungen PBMCs, sodass dadurch Granulozyten ausgeschlossen wurden. Auf frisch entnommenem Vollblut konnten außerdem alle Antikörper uneingeschränkt verwendet werden.

Weiterhin wurde zuvor festgelegt, zwei unabhängige Methoden, das Barcoding und die Normalisierung zu verwenden, um die Schwankungen in der Qualität der Daten gering zu halten.

Mithilfe des CD45-Barcodings konnten die Proben von jeweils drei Patienten zusammengeführt, gleichzeitig an einem Tag prozessiert und gemessen werden. So waren zusätzliche Waschschriffe durch eine kontinuierliche Messung nicht erforderlich und dem Problem der Probenverschleppung wurde vorgebeugt (74). Durch das Barcoding konnten interindividuelle Unterschiede in der Aufbereitung und Färbung der Zellen nach dem Zusammenführen weitgehend minimiert werden. Außerdem konnte der Verbrauch an Reagenzien allgemein und besonders der der Antikörper aus dem Panel um 2/3 gesenkt werden. Da CD45 ein universeller Marker für alle Leukozyten ist, konnten zuvor nicht eliminierte Erythrozyten und CD45-negative Thrombozyten zusätzlich ausgeschlossen werden. Das CD45-Barcoding wurde für diese Untersuchung in der Arbeitsgruppe neu etabliert. Über 97 % der Leukozyten konnten den jeweiligen Donoren zugeordnet werden. Für zukünftige Messungen könnten durch Erhöhung der Probenzahl die Messtage verringert und damit die Variabilität zwischen den Messungen gesenkt werden. Allerdings wäre mit der erhöhten Probenzahl auch eine verlängerte Messzeit verbunden, die dann eine Nachjustierung des Gerätes erfordert, um größere Sensitivitätsverluste, die eine Erfassung seltener Zellpopulationen erschweren, zu minimieren.

Neben dem Barcoding wurde eine Normalisierung der Daten durchgeführt. Finck et al. zeigten, dass in einer dreistündigen Messung mit einer Aufnahme von 2 Millionen Zellen die durchschnittliche CD45-Intensität der letzten 1000 T-Zellen 73 % der Intensität der ersten 1000 T-Zellen betrug (74). Durch eine Normalisierung der Daten wird die durch lange Messzeiten entstandene Messwertabnahme über die Zeit korrigiert.

Die in jeder Messung eingesetzten Kalibrations-Beads zeigten diese zeitabhängigen Intensitätsverluste an und dienten dazu, die Messungen im Nachhinein zu normalisieren. So konnten die biologischen Unterschiede bewertet werden (74). Durch die Normalisierung konnten in dieser Untersuchung nicht nur die Ergebnisse der Proben, die am gleichen

Tag zusammen gemessen wurden, sondern auch die Ergebnisse unterschiedlicher Mess-tage miteinander verglichen werden, ebenso wie Daten, die über mehrere Wochen gesammelt wurden.

### **5.3 Zellanalyse**

Die nicht-supervidierte Analyse ermöglichte einen Überblick über die Gesamtdaten und mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Sie zeigte Auffälligkeiten in Markerexpressionen einzelner Populationen. Das Hauptaugenmerk in dieser Untersuchung lag auf der manuellen Analyse. Exemplarisch wurden Ergebnisse der nicht-supervidierten Analyse nachgegatet.

#### **5.3.1 Eosinophile Granulozyten**

In dieser massenzytometrischen Untersuchung wurde eine erhöhte Frequenz von Eosinophilen im Blut von AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden gemessen. Dies stimmt mit in der Literatur bekannten Veränderungen überein (30; 32). Die erhobenen Daten entsprechen einer Positivkontrolle der Messmethode. Sie deuten an, dass mit der CyTOF-Technologie prinzipiell Blutzellen einer Kohorte zu unterschiedlichen Zeitpunkten relativ quantifiziert werden können.

Das Signal von Typ 2-Zytokinen (IL-4, IL-5) scheint in der Pathogenese der AD eine wichtige Rolle zu spielen. Dies ist belegt durch die hohe Wirksamkeit des IL-4R $\alpha$ /IL-13-Rezeptorblockers Dupilumab, einem in der Therapie der mittelschweren bis schweren AD eingesetzten monoklonalen Antikörper (13). Das von Th2-Zellen sezernierte IL-4 wirkt indirekt auf die Eosinophilen. So kann es bei AD durch Wirkung auf die Expression des Chemokins Eotaxin in dermalen Fibroblasten die Infiltration der Eosinophilen in die Hautläsionen fördern (34). In Hautläsionen von AD-Patienten wurden entsprechend vermehrt Eosinophile gefunden (33). Die bei AD-Patienten vermehrte Sekretion von IL-5 durch Th2-Zellen bewirkt über die oben beschriebenen Mechanismen eine Erhöhung der Eosinophilenfrequenz im Blut (s. Kapitel 1.2.2.1).

Die gefundene erhöhte Frequenz von Eosinophilen bei Patienten mit AD im Vergleich zu Gesunden führte zu der Überlegung, dass eine Depletion dieser Zellen, z.B. durch einen IL-5-Antikörper, die Eosinophilie und die durch die Eosinophilen potentiell verstärkte Entzündung unterbinden könnte. Allerdings zeigte der monoklonale Antikörper gegen

IL-5, Mepolizumab, in zwei Studien mit AD-Patienten, von denen eine vorzeitig beendet wurde, nicht die erwartete Wirkung (80; 81). Die Ergebnisse sprechen bislang eher für einen geringen Effekt von IL-5 und gegen die Wirkung der Eosinophilenzahl auf die Schwere der AD. Hinzu kommt, dass in der vorliegenden Untersuchung keine Korrelation zwischen der relativen Eosinophilenfrequenz im Blut der beiden Patientengruppen und dem Schweregrad (SCORAD) feststellbar war.

Die erhöhte Eosinophilenfrequenz könnte als Epiphänomen gewertet werden und einen Krankheitsmarker für eine bestehende AD darstellen.

Bei näherer Charakterisierung der Zellen zeigten AD-Patienten in dieser Untersuchung einen Trend zu erhöhter Frequenz von CD45RO-exprimierenden Eosinophilen im Blut. Die Unterschiede müssen aufgrund der geringen Fallzahl und ähnlicher Mediane der Frequenzen vorsichtig bewertet werden und sind nur hinweisend auf einen Trend. Der Marker CD45RO wurde bei Asthmapatienten in Zusammenhang mit der Apoptoserate der Eosinophilen diskutiert (82; 83). Die Funktion dieser Eosinophilen bei AD-Patienten ist bisher unbekannt.

Der Phänotyp der Eosinophilen wurde weiterhin mit einer nicht-supervidierten Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) untersucht. Diese Analyse von Zellmarkern auf den Eosinophilen zeigte keine weiteren Auffälligkeiten. Entweder gibt es keine für die AD charakteristischen Eosinophilen oder die Halbwertszeit dieser Zellen im Blut ist mit 8-18 Stunden so kurz (28), dass sich kein charakteristischer Phänotyp ausbilden kann. Außerdem könnten auch in dieser Untersuchung nicht gemessene Oberflächenmarker bedeutend sein.

Zusammenfassend wurden die bei AD-Patienten erhöhten Eosinophilenfrequenzen im Blut mit dieser massenzytometrischen Untersuchung bestätigt. Sie dienen als Positivkontrolle der Methode. Eine Erhöhung der Eosinophilenfrequenzen scheint krankheitsbedingt, unabhängig von der Schwere der Erkrankung, vorzuliegen.

### **5.3.2 NK-Zellen**

NK-Zellen wurden in dieser Untersuchung als CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-Zellen identifiziert und mithilfe der CD56-Expression in CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>bright</sup>-Subpopulationen unterteilt. Die Frequenzen der CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>-Zellen waren bei AD-Patienten und Gesunden vergleichbar. Dies bestätigt vormals publizierte Daten (78). Der prozentuale Anteil der CD56<sup>dim</sup>-

Zellen an den Leukozyten war wie beschrieben höher als der der CD56<sup>bright</sup>-Zellen (36). Im Blut von ADs-Patienten war die CD56<sup>dim</sup>-Frequenz im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert. Dies entspricht im Wesentlichen vorausgehenden Untersuchungen (78; 84; 85). Diese Daten deuten durch schweregradabhängige Unterschiede auf eine besondere Rolle der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in Zusammenhang mit ausgeprägter Inflammation hin.

Die geringere Frequenz der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen im peripheren Blut von ADs-Patienten könnte bei fehlendem Hinweis auf eine gestörte Bildung von NK-Zellen im Knochenmark durch ein bei Inflammation verstärktes Austreten von NK-Zellen vom Blut ins Gewebe bedingt sein. Diese Hypothese unterstützend sind vermehrt NK-Zellen in Hautläsionen von AD-Patienten beschrieben (86).

Alternativ könnte eine erhöhte Apoptoserate zu niedrigerer Frequenz führen und wurde zuvor auch bei der AD angedeutet (78; 84). Um diese Annahme zu stützen, könnten die Apoptosemarker Annexin V, CD95 (Fas-Rezeptor; APO-1) sowie Caspase 3 in weiteren Studien untersucht werden.

NK-Zellen sind mit ihrer Zytotoxizität (CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen) an der Abwehr von Viren und Tumorzellen beteiligt und beeinflussen andere Effektorzellen. Luci et al. wiesen bei AD-Patienten einen Defekt in der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen nach (78). Demnach wäre auch der regulatorische Effekt auf andere Entzündungszellen durch vermehrte Elimination aktivierter Effektorzellen verringert. Die Entzündungsprozesse wären in der Folge verstärkt. Mögliche weitere Funktionen übernehmen die NK-Zellen durch die Expression des Histamin-4-Rezeptors auf ihrer Zelloberfläche. Dieser fördert die Migration der NK-Zellen in die Haut, aktiviert diese und führt zur Freisetzung von thymusaktivitätsregulierendem Chemokin (TARC) durch Dendritische Zellen. Dieses Chemokin wiederum ist an der Rekrutierung der Th2-Zellen beteiligt und kann so die Entzündung fördern (79). So könnten NK-Zellen durch Th2-Zellrekrutierung an den Entzündungsprozessen in der AD beteiligt sein.

Die Frequenzen der zytokinproduzierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im peripheren Blut waren zwischen den Untersuchungsgruppen vergleichbar niedrig. Grundsätzlich wurden diese Zellen zuvor als häufig in der Haut vorkommend beschrieben (37).

Zur Funktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion gibt es bei AD-Patienten widersprüchliche Angaben. Teilweise wird eine erhöhte, teilweise eine erniedrigte Zytokinproduktion beschrieben (36; 78).

Trotz der vergleichbaren Zellfrequenzen im Blut von AD-Patienten und Gesunden könnten diese Zellen in der Haut aufgrund ihrer IFN- $\gamma$  Produktion auch an der Beeinträchtigung der Hautbarriere beteiligt sein und so als Perpetuator wirken. Denn IFN- $\gamma$  scheint in der Haut die Aktivität von zwei Enzymen (Elongase of long chain fatty acid, ELOVL1; und Ceramide synthase 3, CerS3) herunter zu regulieren. Dadurch senken sie die für eine intakte Hautbarriere wichtigen Level der Ceramide mit langkettigen Fettsäuren im Stratum Corneum der Haut. Veränderungen im Ceramid-Profil sind mit abnormaler Permeabilität, wie z.B. bei AD, assoziiert (87). Folglich können Umweltallergene, Pathogene und Viren die Hautbarriere leichter penetrieren und weitere IFN- $\gamma$  Ausschüttung bedingen. Im Mausmodell der AD wurde dieser Mechanismus untersucht und IFN- $\gamma$  war mit Chronizität der Entzündung vergesellschaftet (88). Ob dies auch für den Menschen zutrifft, ergäbe eine Untersuchung der Zytokinproduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Haut. Bei Bestätigung könnte ein spezielles Ansprechen dieser Zellen eine Verschlechterung der Hautbarriere verhindern.

Auch die in der nicht-supervidierten (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) und manuellen Analyse gefundenen erhöhten Frequenzen von CD38 und CD69 exprimierenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen geben einen Hinweis auf eine Beteiligung von NK-Zellsubpopulationen an der Krankheitsentstehung der AD. CD38 ist ein Oberflächenprotein, das zyklische ADP-Ribose synthetisiert, die dann die intrazelluläre Kalziummobilisierung induziert. Der Marker ist gleichzeitig ein Rezeptor für CD31, das auf Endothelzellen exprimiert ist. Ihre Interaktion ist wichtig in der Leukozytenwanderung durch das Endothel (89). CD69 (auch very early activation antigen genannt) wird innerhalb weniger Stunden nach Aktivierung auf unterschiedlichen Immunzellen, einschließlich NK-Zellen, exprimiert (90). In neueren Untersuchungen wird CD69 als Marker für im Gewebe residierende T-Gedächtniszellen und auch NK-Zellen in der Leber diskutiert (91; 92).

Bisher wurden CD38<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nicht bei AD beschrieben. Zur simultanen Expression von CD38 und CD69 auf NK-Zellen gibt es eine Studie mit Patienten mit Dengue-Fieber im Vergleich zu Gesunden. Die Expression auf NK-Zellen ist bei den

Patienten in den ersten Tagen der Infektion signifikant gesteigert und lässt auf eine vermehrte Aktivierung der NK-Zellen zur Virusbekämpfung schließen (93).

Mit dieser massenzytometrischen Untersuchung wurde die Expression von CD38 und CD69 erstmalig auch auf NK-Zellen von AD-Patienten untersucht. Die bei ADs-Patienten im Blut verbliebenen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen scheinen vermehrt aktiviert zu sein. Die höherfrequente Expression der CD38- und CD69-Marker auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen von AD-Patienten führt zu der Hypothese, dass diese zum einen vermehrt aktiviert und zum anderen an Migrationsprozessen beteiligt sind und so ggf. Anteil an den Entzündungsprozessen in der Haut haben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Untersuchung, dass im peripheren Blut von ADs-Patienten im Vergleich zu Gesunden eine geringere CD56<sup>dim</sup> NK-Zellfrequenz vorhanden war und bestätigen so mit anderen Methoden durchgeführte Untersuchungen. Innerhalb dieser Population waren prozentual mehr aktivierte NK-Zellen zu finden. Die vermehrte Aktivierung dieser Zellen weist auf eine bislang unklare Rolle in der Pathogenese der AD hin.

### **5.3.3 Innate Lymphoid Cells 2 (ILC2s)**

Es gibt Hinweise darauf, dass ILC2s eine wichtige Rolle in der Haut bei AD-Patienten spielen (94). Die ILC2s können über ihre Zytokinproduktion (u.a. IL-5, IL-13 und in kleineren Mengen IL-4) Typ 2-Entzündungsprozesse fördern (20). Sie werden in läsionaler Haut von AD-Patienten vermehrt durch TSLP, das bei diesen ebenfalls höhere Konzentrationen aufweist, aktiviert. Eine Depletion der ILCs in einem Mausmodell zeigte eine deutliche Besserung der AD-Symptome. Beim Menschen wurde dies bisher nicht nachgewiesen (95).

In dieser Untersuchung konnten bei der Auswertung der CyTOF-Daten Zellen identifiziert werden, die den etablierten Phänotyp der ILC2s trugen (s. Kapitel 4.3.3).

Die Daten bestätigen die sehr seltene ILC2-Frequenz im Blut (20). Sie sind nach derzeitigem Kenntnisstand Gewebe-residente Zellen und übernehmen immunologische Funktionen an Barriereoberflächen wie Lunge, Darm und Haut (96). Innate lymphoid cells (ILCs) können sich lokal vermehren und werden erst bei chronischen Prozessen, d.h. nach Erschöpfung der Regenerationsfähigkeit in der Haut, aus Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet und über die Blutbahn zu den Geweben transportiert (97). Diese

Eigenschaften der Zellen können ebenfalls die geringe Zahl im Blut und damit die erschwerte Messbarkeit erklären. Bei AD-Patienten sind ILC2s als vermehrt in der Haut beschrieben (20; 43).

Die mit der Massenzytometrie gemessene Zellzahl (<20 Zellen pro Donor) schätzten wir als zu gering ein, um Aussagen zu quantitativen Unterschieden bei AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden treffen zu können. Allerdings scheinen die ILC2s bei AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht in höherer Frequenz vorzuliegen.

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zu ILC2s im Blut von AD-Patienten. Salimi et al. fanden bei der durchflusszytometrischen Untersuchung des Blutes von 15 Gesunden und 8 AD-Patienten keine Unterschiede in der Frequenz (43). Zur besseren Messung dieser Zellen könnten in weiteren Versuchen zunächst alle großen Zellpopulationen wie B- und T-Zellen depletiert werden und ILC2s somit relativ angereichert werden. Unter Berücksichtigung der technisch begrenzten Messzeit, müssten insgesamt weniger Zellen aufgenommen werden und die Ergebnisse wären belastbarer.

#### **5.3.4 T-Zellen**

Die atopische Dermatitis ist eine multifaktorielle Krankheit mit einer gestörten Immunantwort, bei der auch die T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, u.a. nachgewiesen durch Wirkung medikamentöser Therapien (TCR-Signaling-Ciclosporin A; IL4-R $\alpha$ -Akt-Dupilumab) sowie aus Vordaten (12; 44).

In dieser Untersuchung wurden geringe, wenngleich signifikante Veränderungen der CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellfrequenzen im Blut von ADs-Patienten im Vergleich zu Gesunden gefunden. Die gemessenen niedrigeren CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellfrequenzen sowie die vergleichbare CD4<sup>+</sup>-Zellfrequenz stimmen mit Ergebnissen anderer Studien überein (98-101). Teilweise wiesen die Daten eine große Varianz auf, die durch die geringe Gruppengröße bedingt sein kann. Aber auch die Ergebnisse anderer Publikationen sind nicht homogen (98; 99). Deshalb ist anzunehmen, dass bei der AD weniger die Gesamtheit der T-Zellen als vielmehr das Auftreten und die Funktion spezifischer T-Zellpopulationen von Bedeutung sind.

Die adaptive Immunantwort mit ihrer Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis zu bilden spielt bei der AD als chronische Krankheit eine zentrale Rolle. In dieser massenzytometrischen Untersuchung waren die Frequenzen der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-

Gedächtniszellen, charakterisiert durch CD3- und CD45RO-Expression, im peripheren Blut von ADs-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe niedriger. Dies ist gut vereinbar damit, dass Gedächtniszellen in die Haut rekrutiert worden sind. Entsprechend zeigten Untersuchungen von Hautläsionen bei AD-Patienten, dass allergen-spezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermehrt sind (5).

In der nicht-supervidierten Analyse der Daten (T. Sørensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) wurden im Blut von Patienten im Vergleich zu Gesunden durch CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup> charakterisierte Gedächtniszellen identifiziert, die eine erhöhte Expression des späten, da erst nach Wochen auftretenden Aktivierungsmarkers HLADR aufwiesen. Dieses Ergebnis wurde hier mit der manuellen Auswertmethode bestätigt (ADm: P=0,011; ADs: P=0,010).

CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> definieren Effektor-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>), die zum entzündeten Gewebe migrieren, um dort sofortige Effektorfunktionen auszuüben (102). Mit der Zytokinproduktion könnten sie den Entzündungsprozess aufrechterhalten bzw. verstärken. Die erhöhte Expressionsstärke des Aktivierungsmarkers HLADR unterstützt diese Annahme. Mithilfe der Expression von CD27 lassen sich die Zellen in Differenzierungsstufen einteilen. Hierbei zeigt der Verlust der CD27-Expression die fortgeschrittene Differenzierung an (49). CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> repräsentiert eine frühe Reifungsstufe. Die Population besteht aus Zellen, die bereits unumkehrbar zu Th1-Zellen differenziert sind und solchen, die noch nicht endgültig differenziert sind und noch zu Th2-Zellen differenzieren könnten (49). Die hier identifizierte CD27<sup>+</sup>-T-Zellsubpopulation könnte im Zytokin-Gedächtnis flexibel sein. Eine folgende Untersuchung sortierter Zellen und anschließende Zellkultur mit unterschiedlichen Umgebungsbedingungen könnte dazu dienen, die Funktion dieser Zellart in der AD-Pathogenese aufzuklären.

Die Subpopulation könnte in Lymphknoten oder in der Haut aktiviert worden sein und nun auch vermehrt ins Blut ausgeschwemmt werden. Interessant wäre eine Antigenbestimmung zur Erkenntnis, ob diese Zellen spezifisch gegen ein Antigen oder heterogen gegen mehrere gerichtet sind. Ferner könnte die Bestimmung der Zytokinantwort im Th1/2-Milieu Aufschluss darüber geben, ob diese Zellen ein geeignetes Ziel in der AD-Therapie darstellen. Bisher gibt es in der Literatur noch keine Untersuchungen zu diesen Phänotypen bei AD-Patienten, sodass weitere Untersuchungen zur Verteilung dieses Zelltyps zur Klärung der Fragestellungen dienen.



### 5.3.5 Th2-Zellen

In dieser Untersuchung wurden die Th2-Zellen erstmals massenzytometrisch identifiziert. Th2-Zellen spielen in der AD eine besondere Rolle, denn sie fördern mit ihrer Produktion der Zytokine IL-4 und IL-13 die Typ 2-Entzündung (1). Außerdem wurden in Hautläsionen von AD-Patienten mehr Th2-Zellen nachgewiesen als in der Haut von Gesunden (22). Trotz dieser Kenntnis gibt es bisher wenig Daten zur Messung von Th2-Frequenzen im Blut von AD-Patienten.

Bei den mit der Massenzytometrie identifizierten Th2-Zellen bei 21 Probanden (n=7 pro Untersuchungsgruppe) wurden vergleichbare Frequenzen zwischen den Gruppen gemessen, allerdings mit ausgeprägter Streuung. Um Unterschiede in den Frequenzen sehen zu können, wäre nach einer Gruppengrößenberechnung eine Anzahl von 64 Probanden pro Gruppe bei ADs-Patienten und 507 Probanden pro Gruppe bei ADm-Patienten und jeweils gleicher Zahl Gesunder erforderlich. Diese Berechnungen unterschieden sich von den von Cosmi et al. gefundenen höheren CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>-Th2-Zellfrequenz im Blut bereits bei 10 AD-Patienten und 19 gesunden Kontrollen (53). Allerdings waren weder Faktoren wie das Alter der Probanden noch der SCORAD bzw. eine Schweregradeinteilung der AD angegeben. Zudem muss die Verwendung unterschiedlicher Messmethoden (Durchflusszytometrie vs. Massenzytometrie) beachtet werden. Zusätzlich wurde in dieser massenzytometrischen Untersuchung eine höhere Zahl an Zelllinienmarkern ausgeschlossen, sodass andere CRTH2-exprimierende Zellpopulationen, die die Zellfrequenzen beeinflussen könnten (wie ILC2s), ausgeschlossen wurden.

In anderen Untersuchungen wurden die Th2-Zellen nicht über CD4- und CRTH2-Expression sondern als IL-13 exprimierende CD4<sup>+</sup>-Zellen definiert (103). Allerdings exprimieren etwa 20-25 % der CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen weder IL-4, IL-5 noch IL-13 (53). Die Expression könnte ebenfalls abhängig vom Messzeitpunkt sein. Es ist also fraglich, ob tatsächlich reine Th2-Zellen identifiziert wurden. CRTH2 ist daher bisher der zuverlässigste Marker zur Identifikation der Th2-Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Untersuchung keine systematische Zu- oder Abnahme der Th2-Zellfrequenzen, gemessen durch CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>-Expression im peripheren Blut von AD-Patienten und Gesunden. Gegebenenfalls könnten Subpopulationen der Th2-Zellen bedeutend sein, die durch weitere Marker charakterisiert werden müssten. Weiter könnte auch das Blut nicht der Hauptort der Th2-Zellen sein, sodass eine

Untersuchung in anderen Kompartimenten, wie bspw. der Haut, nähere Erkenntnisse bringen würde.

### 5.3.6 Tregs

In dieser Untersuchung war die Frequenz der regulatorischen T-Zellen, charakterisiert durch  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$  (72), innerhalb der  $CD4^+$ -T-Zellen bei AD-Patienten erhöht. In Bezug auf die Leukozytenzahl waren die Treg-Frequenzen vergleichbar.

Bisher gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse zu Treg-Frequenzen im Blut von AD-Patienten und Gesunden. In einigen Studien wurden erhöhte Treg-Frequenzen bei AD-Patienten gefunden (56; 104; 105). Andere Untersuchungen fanden keinen Unterschied in Frequenzen von  $FoxP3^+CD4^+$ -Zellen (bezogen auf  $CD4^+$ ) (106).

Bei dieser heterogenen Datenlage muss beachtet werden, dass die Tregs mit unterschiedlichen Methoden als  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ,  $CD4^+CD25^{high}$  oder  $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$  identifiziert werden können. Einerseits erfolgt also eine Oberflächenfärbung (CD25 und CD127). Bei FoxP3 hingegen ist eine intrazelluläre Färbung mit Fixierung und anschließender Perforation der Zellmembran obligat. In dieser massenzytometrischen Untersuchung wurden nur Oberflächenmarker gefärbt, sodass der Transkriptionsfaktor nicht untersucht wurde. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Kombination von  $CD4^+$ ,  $CD25^{high}$  und  $CD127^{-/low}$  eine reine Treg-Population identifiziert (107). Die verschiedenen Untersuchungsmethoden könnten die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen. Deshalb wäre eine einheitliche Definition zur Identifikation der Tregs sinnvoll. Ein Leitfaden mit einer Empfehlung zur Identifikation der Immunzellen bezogen auf die Durchflusszytometrie wurde von Cossarizza et al. nach Abschluss dieser Untersuchung erstellt (58).

Bisher ist die Funktion der Tregs in der AD noch nicht geklärt, aber eine Beteiligung am Krankheitsmechanismus wahrscheinlich. Ein genetisch bedingtes Fehlen von Tregs führt zu einer Immundysregulation, die mit einer allergischen Hautinflammation assoziiert ist. Kürzlich wurde der  $ROR\alpha$  (retinoic-related orphan receptor  $\alpha$ )-Rezeptor auf Tregs in Mensch und Maus identifiziert. Dieser ist, wie im Mausmodell gezeigt, ein Regulator für Treg-Gene, die für die Suppression der allergischen Hautentzündung verantwortlich sind. Die  $ROR\alpha$ -Expression auf murinen Tregs supprimiert eine ILC2-abhängige allergische Hautentzündung und vermindert die Th2-Zellrekrutierung in die Haut. Eine verringerte Expression kann daher eine verstärkte Hautentzündung zur Folge haben (94).

Interessanterweise wird ROR $\alpha$  auf Tregs im humanen Blut seltener exprimiert als in der Haut (94), sodass hier zwischen Haut- und Blut-Tregs unterschieden werden muss. In der Haut könnten spezielle Faktoren die Expression regulieren. Diese könnten ein Ziel für mögliche Therapieansätze darstellen.

Die Treg-Frequenzen innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen im Blut von Erkrankten im Vergleich zu Gesunden waren in dieser Untersuchung erhöht. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Tregs die reduzierte Suppression der pro-inflammatorischen Antwort durch erhöhte Proliferation kompensieren können (108). Weiterhin könnten Tregs durch andere Effektorzellen wie CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen aus der Haut verdrängt worden sein, sodass deren Frequenz innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Zellen zunimmt. Bei Annahme, dass die Treg-Produktion stets konstant ist, ist diese Zunahme also durch eine Umverteilung bedingt.

Massenzytometrisch wurden in dieser Untersuchung weiterhin HLADR und CD38 auf den Tregs gemessen. In der nicht supervidierten Analyse (T. Sörensen, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Forschungslabor/AG Bioinformatik) zeigten sich erhöhte Frequenzen im Blut von HLADR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Tregs. HLADR ist ein Aktivierungsmarker auf T-Zellen (109). CD38 übernimmt verschiedene Funktionen, ist u.a. an der Leukozytenwanderung durch das Endothel beteiligt und kann als Aktivierungsmarker genutzt werden (89). Die hier gefundene erhöhte Frequenz der aktivierten Zellen deutet ebenfalls auf eine Beteiligung der Tregs am Krankheitsprozess hin. Ihre suppressive Funktion könnte im Gewebe durch proinflammatorische Zytokine gehemmt werden, sodass sie ihre eigentliche Schutzfunktion verlieren (108).

Zusammenfassend wurden in dieser Untersuchung Veränderungen in Treg-Frequenzen und Subpopulationen gefunden, die auf eine Rolle in der Pathogenese der AD hindeuten. Innerhalb der Tregs wurde ein erhöhter Anteil von aktivierten (HLADR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>) Tregs gemessen. Die Expression von CD38 könnte ebenfalls auf eine Beteiligung an der Migration der Zellen durch das Endothel hinweisen. Diese Zellen sollten in weiteren Studien bspw. in der Haut charakterisiert werden, um deren Verteilung und Funktion zu ermitteln.

### **5.3.7 B-Zellen**

In Hautläsionen von AD-Patienten wurden auch B-Zellen neben CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellinfiltraten gefunden (65). Aktivierte B-Zellen präsentieren Antigene und produzieren Zytokine, die über spezifische Rezeptoren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen an den Ort der Entzündung

locken können (65). Über diesen Mechanismus können die B-Zellen die Entzündung fördern und aufrechterhalten.

Eine klinische Studie mit dem CD20-Antikörper Rituximab zeigte eine Verbesserung der Symptome von AD-Patienten. Dieser Antikörper depletierte alle B-Zellen im Blut und 50 % der B-Zellen in der Haut. Weiterhin fanden sich bei Verringerung der B-Zellen weniger T-Zellinfiltrate in den Hautläsionen und eine verringerte T-Zellaktivierung im Blut (65). Möglicherweise war die Zerstörung der B-Zellen in der Haut sowie die Wirkung auf die T-Zellen für die Verbesserung der Symptomatik verantwortlich. Allerdings war die Fallzahl mit  $n=6$  gering und Placebokontrollen fehlten (65). Zudem zeigte der Einsatz von Rituximab in einer weiteren Untersuchung bei drei Patienten keine Wirksamkeit (110). Um eine abschließende Aussage zur Wirkung von Rituximab bei AD-Patienten und zur Bedeutung der B-Zellen in der Pathogenese treffen zu können, müsste eine placebo-kontrollierte klinische Studie mit höherer Fallzahl durchgeführt werden.

In dieser Untersuchung wurden vergleichbare B-Zellfrequenzen im peripheren Blut von AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden gemessen. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Untersuchungen (63; 64).

Innerhalb der B-Zellen konnten mit der CyTOF-Technologie Subpopulationen durch die unterschiedliche Expression des Immunglobulins D (IgD) und CD27 identifiziert werden. In allen bisher durchgeführten Untersuchungen zu B-Zellsubpopulationen konnten keine übereinstimmenden Ergebnisse gefunden werden (63; 64). In dieser Untersuchung wurden mittels CyTOF-Technologie in den naiven B-Zellen (IgD<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>), den klassengewechselten B-Gedächtniszellen (IgD<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>) und den nicht-klassengewechselten B-Gedächtniszellen (IgD<sup>+</sup> und CD27<sup>+</sup>) keine Frequenzunterschiede zwischen Gesunden und AD-Patienten gemessen.

Auch die spezifische Untersuchung von CD1c sowie von CD38 und CD69 als Aktivierungsmarker auf B-Zellsubpopulationen zeigte keine Auffälligkeiten. CD1c wird als an der Antigenpräsentation der B-Zellen beteiligter Faktor diskutiert (89; 111; 112). Nur auf klassengewechselten B-Zellen wurde ein Trend zu einer erhöhten Expressionsstärke von CD38 festgestellt ( $P=0,048$ ). Allerdings ist dies aufgrund der geringen Fallzahl vorsichtig zu bewerten.

Die derzeitige Studienlage lässt eher auf eine untergeordnete Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der AD schließen.

## 5.4 Limitationen

In diese Untersuchung wurden nur Patienten mit extrinsischer AD, der mit 80 % häufigsten Form der AD, die durch erhöhte Gesamt-IgE-Serumspiegel und multiple Sensibilisierungen charakterisiert ist, eingeschlossen (7). Die Ergebnisse können daher nicht ungeprüft auf Patienten mit der intrinsischen Form übertragen werden. Durch diese Eingrenzung konnte eine Fallzahlreduktion erreicht werden.

Weiterhin wurden nur kaukasische Patienten eingeschlossen, um eine homogene Kohorte zu erhalten und ein mögliches Bias zu vermeiden (6).

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität erfolgte mithilfe des SCORADs. Zwischen den beiden Patientengruppen wurden in den Zellfrequenzen oftmals keine Unterschiede gefunden. Entweder gibt es keine schweregradabhängigen Veränderungen oder diese wären nur durch Bestimmung zusätzlicher Klassifizierungsmarker erfassbar. In folgenden Untersuchungen könnten weitere Marker wie bspw. der EASI in Hinblick auf eine Korrelation mit Zellfrequenzen untersucht werden.

Dies war eine Untersuchung, bei der durch eine Fallzahlschätzung mit  $P=0,05$  und einer Effektstärke von 80 % eine Größe von 20 Personen pro Gruppe als ausreichend angesehen wurde, um signifikante Unterschiede zu detektieren. In Zellpopulationen mit kleineren Frequenzen, wie den Th2-Zellen, wurde jedoch gezeigt, dass eine Untersuchung von mindestens 64 Personen pro Gruppe notwendig wäre, um statistisch signifikante Unterschiede in Zellfrequenzen zu erkennen.

Die Anzahl der messbaren Parameter war begrenzt. Es war daher nicht möglich sämtliche Untergruppen der Zellpopulationen zu charakterisieren. Die Untersuchung erlaubte jedoch einen Überblick über die Leukozytenpopulationen im Blut von AD-Patienten und Gesunden. In weiteren Untersuchungen könnten spezielle Antikörper für spezifische Subpopulationen in einzelnen Panels zusammengestellt und gemessen werden.

In dieser massenzytometrischen Untersuchung wurden die Blutproben am Tag der Entnahme gemessen. Dies war aufwendig und begrenzte die Akquise. Für zukünftige Messungen kann eine Einlagerung von Blutproben, die zuvor mit einem für die Zellstabilisierung geeigneten, nicht-Epitop-markierenden Reagenz fixiert wurden, in Erwägung gezogen werden. Die Patientenproben können so über einen längeren Zeitraum gesammelt und kurz hintereinander gemessen werden (113). Durch Verwendung dieser Fixiertechnik würden auch technische Schwankungen des Gerätes begrenzt und die Stabilität der

Antikörper eher gewährleistet. Nachteil der Verwendung ist allerdings, dass einige Marker, u.a. Chemokinrezeptoren nicht mehr angefärbt werden könnten. Für eine bessere Stabilität der gekoppelten Antikörper könnten in Zukunft fertige Antikörperansätze für alle Messungen einer Kohorte vorbereitet und bei - 80 °C gelagert werden (113).

Trotz beschriebener geringer Einstrahlung in Nachbar-Massenkanäle bei der Massenzytometrie (114) war auch nach Normalisierung ein Einstrahlen des CD16 (169 Thulium)- in den CD3 (170 Erbium)-Kanal auffällig. Dies kann in weiteren massenzytometrischen Untersuchungen mit mittlerweile verfügbaren Kompensationsbeads verhindert werden (115).

Durch die Messung aller Leukozytenpopulationen, d.h. auch der Neutrophilen Granulozyten, wurde ein Bias durch Vorselektion, wie es bei der Analyse von PBMCs der Fall wäre, vermieden. Es wurden keine Auffälligkeiten in Neutrophilenfrequenzen gefunden. Aus diesen Erkenntnissen könnten die Neutrophilen in folgenden Untersuchungen vor den Messungen ausgeschlossen oder eine Zellanreicherung bestimmter seltener Populationen, z.B. ILC2s durchgeführt werden. Dies führt zu einer Messzeitverringerung und erhöht gleichzeitig die Belastbarkeit der Daten in Bezug auf seltene Populationen. Alternativ könnten zur näheren Charakterisierung der hier gefundenen Zellpopulationen ebenfalls Antikörperpanels für die Durchflusszytometrie entworfen werden.

## **5.5 Ausblicke und Ansätze für mögliche weiterführende Studien**

In dieser massenzytometrischen Untersuchung wurden Auffälligkeiten in Zellfrequenzen im Blut von AD-Patienten gegenüber Gesunden gefunden. Zwar war die Zulassung des Antikörpers Dupilumab ein entscheidender Schritt in der Therapie der moderaten bis schweren AD (16), dennoch sind die Mechanismen der Krankheitsentstehung noch nicht bekannt und die Gruppe der AD-Patienten scheint heterogen. Es besteht Bedarf in der Grundlagenforschung, um eine kausale Therapie entwickeln zu können.

Mit dieser Untersuchung konnten erstmals zahlreiche bekannte Immunzellpopulationen zeitgleich in einer Probe im Blut von AD-Patienten und Gesunden gemessen werden. Künftig könnte die CyTOF-Methode dazu eingesetzt werden, Zellen bei AD-Patienten nicht nur im Blut sondern auch in anderen Organen zu detektieren und damit krankheitsspezifische Zellverschiebungen aufzudecken.

Weiterhin stellen die hier gemessenen Veränderungen in antigenspezifischen und unspezifischen Zellpopulationen, insbesondere der T- und NK-Zellsubpopulationen eine Grundlage für weitere Forschungsansätze dar. So könnten die identifizierten Zellpopulationen mit modifizierten Antikörperpanels näher untersucht und charakterisiert werden und dadurch zum besseren Verständnis der Pathogenese der AD beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. 2018. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers* 4:1
2. Werfel T, Schwerk N, Hansen G, Kapp A. 2014. The diagnosis and graded therapy of atopic dermatitis. *Dtsch Arztebl Int* 111:509-20, i
3. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. 2013. [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56:698-706
4. Weidinger S, Novak N. 2016. Atopic dermatitis. *Lancet* 387:1109-22
5. Bieber T. 2008. Atopic dermatitis. *The New England journal of medicine* 358:1483-94
6. Werfel T, Allam JP, Biedermann T, Eyerich K, Gilles S, Guttman-Yassky E, Hoetzenecker W, Knol E, Simon HU, Wollenberg A, Bieber T, Lauener R, Schmid-Grendelmeier P, Traidl-Hoffmann C, Akdis CA. 2016. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 138:336-49
7. Werfel T, Biedermann T. 2015. Current novel approaches in systemic therapy of atopic dermatitis: specific inhibition of cutaneous Th2 polarized inflammation and itch. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 15:446-52
8. Hanifin JM, Rajka G. 1980. Diagnostic features of atopic dermatitis. pp. 44-7. Stockholm: Acta Dermatovener
9. Thijs JL, Drylewicz J, Fiechter R, Strickland I, Sleeman MA, Herath A, May RD, Bruijnzeel-Koomen C, Knol EF, Giovannone B, de Bruin-Weller MS, Nierkens S, Hijnen DJ. 2017. EASI p-EASI: Utilizing a combination of serum biomarkers offers an objective measurement tool for disease severity in atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 140:1703-5
10. Darsow U, Lubbe J, Taieb A, Seidenari S, Wollenberg A, Calza AM, Giusti F, Ring J, European Task Force on Atopic D. 2005. Position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 19:286-95
11. Werfel T, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, Diepgen T, Folster-Holst R, Gieler U, Heratizadeh A, Kahle J, Kapp A, Nast A, Nemat K, Ott H, Przybilla B, Roecken M, Schlaeger M, Schmid-Grendelmeier P, Schmitt J, Schwennesen T, Staab D, Worm M, Association of Scientific Medical Societies of G. 2016. [Not Available]. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 14:e1-75
12. Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DY. 2017. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 139:S65-S76
13. Seger EW, Wechter T, Strowd L, Feldman SR. 2018. Relative efficacy of systemic treatments for atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*
14. Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, Beck LA, Blauvelt A, Cork MJ, Silverberg JJ, Deleuran M, Kataoka Y, Lacour JP, Kingo K, Worm M, Poulin Y, Wollenberg A, Soo Y, Graham NM, Pirozzi G, Akinlade B, Staudinger H, Mastey V, Eckert L, Gadkari A, Stahl N, Yancopoulos GD, Ardeleanu M, Solo, Investigators S. 2016. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 375:2335-48
15. Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, Simpson EL, Papp KA, Hong HC, Rubel D, Foley P, Prens E, Griffiths CEM, Etoh T, Pinto PH, Pujol RM, Szepietowski JC, Ettlner K, Kemeny L, Zhu X, Akinlade B, Hultsch T, Mastey V, Gadkari A, Eckert L, Amin N, Graham NMH, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD, Shumel B. 2017. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 389:2287-303
16. Ariens LFM, Bakker DS, van der Schaft J, Garritsen FM, Thijs JL, de Bruin-Weller MS. 2018. Dupilumab in atopic dermatitis: rationale, latest evidence and place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis* 9:159-70
17. Werfel T, Layton G, Yeadon M, Whitlock L, Osterloh I, Jimenez P, Liu W, Lynch V, Asher A, Tsianakas A, Purkins L. 2019. Efficacy and safety of the histamine H4 receptor antagonist ZPL-3893787 in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 143:1830-7 e4
18. Bin L, Leung DY. 2016. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol* 12:52



19. Silverberg NB, Silverberg JI. 2015. Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis? *Cutis* 96:359-61
20. Roediger B, Kyle R, Le Gros G, Weninger W. 2014. Dermal group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis and allergy. *Curr Opin Immunol* 31:108-14
21. Zhu J. 2015. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* 75:14-24
22. Scheerer C, Eyerich K. 2018. [Pathogenesis of atopic dermatitis]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*
23. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N. 2006. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 118:214-9
24. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Hogh JK, Hellgren LI, Jemec GB, Agner T, Weidinger S. 2010. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* 65:911-8
25. Voegeli R, Rawlings AV, Breternitz M, Doppler S, Schreier T, Fluhr JW. 2009. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *The British journal of dermatology* 161:70-7
26. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin BQ, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, van Zelm MC, Zola H, Clark G. 2015. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *Journal of immunology* 195:4555-63
27. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 13:9-22
28. Park YM, Bochner BS. 2010. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy, asthma & immunology research* 2:87-101
29. Novak NB, B. 2004. Pathophysiologie der atopischen Dermatitis: Neue Erkenntnisse und der Nutzen für die Praxis. *Dtsch Arztebl Int* 101:A108-20
30. Jenerowicz D, Czarnecka-Operacz M, Silny W. 2007. Peripheral blood eosinophilia in atopic dermatitis. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica* 16:47-52
31. Leiferman KM. 1994. Eosinophils in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 94:1310-7
32. Simon D, Braathen LR, Simon HU. 2004. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy* 59:561-70
33. Blanchard C, Rothenberg ME. 2009. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol* 101:81-121
34. Gahr N, Folster-Holst R, Weichenthal M, Christophers E, Schroder JM, Bartels J. 2011. Dermal fibroblasts from acute inflamed atopic dermatitis lesions display increased eotaxin/CCL11 responsiveness to interleukin-4 stimulation. *The British journal of dermatology* 164:586-92
35. Juelke K, Romagnani C. 2016. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr Opin Immunol* 38:75-85
36. von Bubnoff D, Andres E, Hentges F, Bieber T, Michel T, Zimmer J. 2010. Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol* 125:60-8
37. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. 2017. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol* 8:892
38. Mandal A, Viswanathan C. 2015. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 8:47-55
39. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503-10
40. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H. 2011. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol* 12:1055-62
41. Mjosberg J, Bernink J, Golebski K, Karrich JJ, Peters CP, Blom B, te Velde AA, Fokkens WJ, van Drunen CM, Spits H. 2012. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37:649-59
42. Hammad H, Lambrecht BN. 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43:29-40
43. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, Huang LC, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie AN, Fallon PG, Ogg GS. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med* 210:2939-50

44. Guada M, Belouqui A, Kumar MN, Preat V, Dios-Vieitez Mdel C, Blanco-Prieto MJ. 2016. Reformulating cyclosporine A (CsA): More than just a life cycle management strategy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 225:269-82
45. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. 2006. Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology* 126:32-41
46. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24:133-9
47. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012:925135
48. Werfel T. 2009. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 129:1878-91
49. Fritsch RD, Shen X, Sims GP, Hathcock KS, Hodes RJ, Lipsky PE. 2005. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *Journal of immunology* 175:6489-97
50. Cosmi L, Annunziato F, Maggi E, Romagnani S, Manetti R. 2001. Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *International archives of allergy and immunology* 125:273-9
51. Berger A. 2000. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321:424
52. Oettgen HC, Geha RS. 1999. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest* 104:829-35
53. Cosmi L, Annunziato F, Galli MIG, Maggi RME, Nagata K, Romagnani S. 2000. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol* 30:2972-9
54. McHugh RS, Shevach EM. 2002. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110:693-702
55. Bacher P, Scheffold A. 2018. Antigen-specific regulatory T-cell responses against aeroantigens and their role in allergy. *Mucosal Immunol*
56. Samochocki Z, Alifier M, Boder P, Jeziorkowska R, Rosiak E, Jurkiewicz B, Glinska O, Glinski W, Stankiewicz W. 2012. T-regulatory cells in severe atopic dermatitis: alterations related to cytokines and other lymphocyte subpopulations. *Archives of dermatological research* 304:795-801
57. Fry TJ, Mackall CL. 2005. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *Journal of immunology* 174:6571-6
58. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V, Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Buscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, De Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnenberg VS, Dorner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Dreher A, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Forster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, Garcia-Godoy MD, Geginat J, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grutzkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jack HM, Javega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, Kienhofer D, Kroneis T, Kunkel D, Kurts C, Kvistborg P, Lannigan J, Lantz O, Larbi A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Levings MK, Litwin V, Liu Y, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, Lovett-Racke A, Lubberts E, Ludewig B, Lugli E, Maecker HT, Martrus G, Matarese G, Maueroeder C, McGrath M, McInnes I, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Mills K, Mirrer D, Mjosberg J, Moore J, Moran B, Moretta A, Moretta L, Mosmann TR, Muller S, Muller W, Munz C, Multhoff G, Munoz LE, Murphy KM, Nakayama T, Nasi M, Neudorfl C, Nolan J, Nourshargh S, O'Connor JE, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Peterson P, Peth C, Petriz J, Philips D, Pickl W, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Pucillo C, Quataert SA, Radstake T, Rajwa B, Rebhahn JA, Recktenwald D, Remmerswaal EBM, Rezvani K, Rico LG, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruckert B, Ruland J, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sawitzki B, Scheffold A, Schiemann M, Schildberg F, Schimisky E, Schmid SA, Schmitt S, Schober K, Schuler T, Schulz AR, Schumacher T, Scotta C, Shankey TV, Shemer A, Simon AK, Spidlen J, Stall AM, Stark R, Stehle C, Stein M, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Tarnok

- A, Tian Z, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trotter J, Ulrich H, van der Braber M, van Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk HD, von Volkman K, Waisman A, Walker R, Ward MD, Warnatz K, Warth S, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Wiedemann A, Wienands J, Willimsky G, Wing J, Wurst P, Yu L, Yue A, Zhang Q, Zhao Y, Ziegler S, Zimmermann J. 2017. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* 47:1584-797
59. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. 2005. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116:961-8; quiz 9
  60. Bacher P, Scheffold A. 2018. The effect of regulatory T cells on tolerance to airborne allergens and allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 142:1697-709
  61. Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. 2006. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 117:176-83
  62. Chatila TA. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116:949-59; quiz 60
  63. Czarnowicki T, Gonzalez J, Bonifacio KM, Shemer A, Xiangyu P, Kunjraiva N, Malajian D, Fuentes-Duculan J, Esaki H, Noda S, Estrada Y, Xu H, Zheng X, Krueger JG, Guttman-Yassky E. 2016. Diverse activation and differentiation of multiple B-cell subsets in patients with atopic dermatitis but not in patients with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 137:118-29 e5
  64. Heeringa JJ, Hajdarbegovic E, Thio HB, van Zelm MC. 2016. Systemic B-cell abnormalities in patients with atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol* 138:317-8
  65. Simon D, Hosli S, Kostylina G, Yawalkar N, Simon HU. 2008. Anti-CD20 (rituximab) treatment improves atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 121:122-8
  66. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. 2012. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in immunology* 33:323-32
  67. Lou X, Zhang G, Herrera I, Kinach R, Ornatsky O, Baranov V, Nitz M, Winnik MA. 2007. Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays. *Angewandte Chemie* 46:6111-4
  68. Majonis D, Herrera I, Ornatsky O, Schulze M, Lou X, Soleimani M, Nitz M, Winnik MA. 2010. Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays. *Analytical chemistry* 82:8961-9
  69. 1993. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 186:23-31
  70. Schmitt J, Langan S, Deckert S, Svensson A, von Kobyletzki L, Thomas K, Spuls P, Harmonising Outcome Measures for Atopic Dermatitis I. 2013. Assessment of clinical signs of atopic dermatitis: a systematic review and recommendation. *J Allergy Clin Immunol* 132:1337-47
  71. Oakley A. 2009. SCORAD. <https://www.dermnetnz.org/topics/scorad/> (eingesehen am 23.01.2019)
  72. Baumgart S, Peddinghaus A, Schulte-Wrede U, Mei HE, Grutzkau A. 2017. OMIP-034: Comprehensive immune phenotyping of human peripheral leukocytes by mass cytometry for monitoring immunomodulatory therapies. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 91:34-8
  73. Mei HE, Leipold MD, Schulz AR, Chester C, Maecker HT. 2015. Barcoding of live human peripheral blood mononuclear cells for multiplexed mass cytometry. *Journal of immunology* 194:2022-31
  74. Finck R, Simonds EF, Jager A, Krishnaswamy S, Sachs K, Fantl W, Pe'er D, Nolan GP, Bendall SC. 2013. Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 83:483-94
  75. Olsen LR, Leipold MD, Pedersen CB, Maecker HT. 2018. The anatomy of single cell mass cytometry data. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*
  76. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, Saeys Y. 2015. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 87:636-45
  77. Sorensen T, Baumgart S, Durek P, Grutzkau A, Haupl T. 2015. immunoClust--An automated analysis pipeline for the identification of immunophenotypic signatures in high-dimensional

- cytometric datasets. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 87:603-15
78. Luci C, Gaudy-Marqueste C, Rouzairre P, Audonnet S, Cognet C, Hennino A, Nicolas JF, Grob JJ, Tomasello E. 2012. Peripheral natural killer cells exhibit qualitative and quantitative changes in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 166:789-96
  79. Ehling S, Rossbach K, Dunston SM, Stark H, Baumer W. 2016. Allergic inflammation is augmented via histamine H4 receptor activation: The role of natural killer cells in vitro and in vivo. *J Dermatol Sci* 83:106-15
  80. Oldhoff JM, Darsow U, Werfel T, Katzer K, Wulf A, Laifaoui J, Hijnen DJ, Plotz S, Knol EF, Kapp A, Bruijnzeel-Koomen CA, Ring J, de Bruin-Weller MS. 2005. Anti-IL-5 recombinant humanized monoclonal antibody (mepolizumab) for the treatment of atopic dermatitis. *Allergy* 60:693-6
  81. Trials GC. 2017. *Efficacy and Safety Study of Mepolizumab in Subjects With Moderate to Severe Atopic Dermatitis (NCT 03055195)*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03055195> (eingesehen am 23.01.2019)
  82. Blaylock MG, Sexton DW, Walsh GM. 1999. Ligation of CD45 and the isoforms CD45RA and CD45RB accelerates the rate of constitutive apoptosis in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 104:1244-50
  83. Blaylock MG, Lipworth BJ, Dempsey OJ, Duncan CJ, Lee DK, Lawrie A, Douglas JG, Walsh GM. 2003. Eosinophils from patients with asthma express higher levels of the pan-leucocyte receptor CD45 and the isoform CD45RO. *Clin Exp Allergy* 33:936-41
  84. Katsuta M, Takigawa Y, Kimishima M, Inaoka M, Takahashi R, Shiohara T. 2006. NK cells and gamma delta+ T cells are phenotypically and functionally defective due to preferential apoptosis in patients with atopic dermatitis. *Journal of immunology* 176:7736-44
  85. Schmid-Ott G, Jaeger B, Adamek C, Koch H, Lamprecht F, Kapp A, Werfel T. 2001. Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 107:171-7
  86. Buentke E, Heffler LC, Wilson JL, Wallin RP, Lofman C, Chambers BJ, Ljunggren HG, Scheynius A. 2002. Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--Malassezia-influenced cell interaction. *The Journal of investigative dermatology* 119:850-7
  87. Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, Mizutani Y, Fujisawa T, Banno Y, Seishima M. 2014. Interferon-gamma decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. *The Journal of investigative dermatology* 134:712-8
  88. Kanoh H, Ishitsuka A, Fujine E, Matsuhaba S, Nakamura M, Ito H, Inagaki N, Banno Y, Seishima M. 2019. IFN-gamma Reduces Epidermal Barrier Function by Affecting Fatty Acid Composition of Ceramide in a Mouse Atopic Dermatitis Model. *J Immunol Res* 2019:3030268
  89. Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E, Funaro A, Horenstein AL, Malavasi F. 2013. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom* 84:207-17
  90. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97:159-65
  91. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, Bickham KL, Lerner H, Goldstein M, Sykes M, Kato T, Farber DL. 2013. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38:187-97
  92. Stegmann KA, Robertson F, Hansi N, Gill U, Pallant C, Christophides T, Pallett LJ, Peppas D, Dunn C, Fusai G, Male V, Davidson BR, Kennedy P, Maini MK. 2016. CXCR6 marks a novel subset of T-bet(lo)Eomes(hi) natural killer cells residing in human liver. *Scientific reports* 6:26157
  93. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. 2006. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* 143:345-56
  94. Malhotra N, Leyva-Castillo JM, Jadhav U, Barreiro O, Kam C, O'Neill NK, Meylan F, Chambon P, von Andrian UH, Siegel RM, Wang EC, Shivdasani R, Geha RS. 2018. RORalpha-expressing T regulatory cells restrain allergic skin inflammation. *Sci Immunol* 3
  95. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, Noti M, Monticelli LA, Sonnenberg GF, Hepworth MR, Van Voorhees AS, Comeau MR, Artis D. 2013. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med* 5:170ra16

96. Mindt BC, Fritz JH, Duerr CU. 2018. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Pulmonary Immunity and Tissue Homeostasis. *Front Immunol* 9:840
97. Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. 2015. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* 350:981-5
98. Zachary CB, MacDonald DM. 1983. Quantitative analysis of T-lymphocyte subsets in atopic eczema, using monoclonal antibodies and flow cytofluorimetry. *The British journal of dermatology* 108:411-22
99. Nakazawa M, Sugi N, Kawaguchi H, Ishii N, Nakajima H, Minami M. 1997. Predominance of type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 99:673-82
100. Leung DY, Wood N, Dubey D, Rhodes AR, Geha RS. 1983. Cellular basis of defective cell-mediated lympholysis in atopic dermatitis. *Journal of immunology* 130:1678-82
101. Leung DY. 1992. Immunopathology of atopic dermatitis. *Springer Semin Immunopathol* 13:427-40
102. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-63
103. Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, Khattri S, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suarez-Farinas M, Krueger JG, Guttman-Yassky E. 2015. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population. *J Allergy Clin Immunol* 136:104-15 e7
104. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. 2004. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 113:756-63
105. Zhang YY, Wang AX, Xu L, Shen N, Zhu J, Tu CX. 2016. Characteristics of peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells and related cytokines in severe atopic dermatitis. *European journal of dermatology : EJD* 26:240-6
106. Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. 2009. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 64:1588-96
107. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-11
108. Roesner LM, Floess S, Witte T, Olek S, Huehn J, Werfel T. 2015. Foxp3(+) regulatory T cells are expanded in severe atopic dermatitis patients. *Allergy* 70:1656-60
109. Ferenczi K, Burack L, Pope M, Krueger JG, Austin LM. 2000. CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry. *J Autoimmun* 14:63-78
110. McDonald BS, Jones J, Rustin M. 2016. Rituximab as a treatment for severe atopic eczema: failure to improve in three consecutive patients. *Clin Exp Dermatol* 41:45-7
111. Allan LL, Stax AM, Zheng DJ, Chung BK, Kozak FK, Tan R, van den Elzen P. 2011. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. *Journal of immunology* 186:5261-72
112. Heine G, Drozdenko G, Grun JR, Chang HD, Radbruch A, Worm M. 2014. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. *Eur J Immunol* 44:1615-21
113. Schulz AR, Stanislawiak S, Baumgart S, Grutzkau A, Mei HE. 2017. Silver nanoparticles for the detection of cell surface antigens in mass cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 91:25-33
114. Tricot S, Meyrand M, Sammiceli C, Elhmouzi-Younes J, Corneau A, Bertholet S, Malissen M, Le Grand R, Nuti S, Luche H, Cosma A. 2015. Evaluating the efficiency of isotope transmission for improved panel design and a comparison of the detection sensitivities of mass cytometer instruments. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 87:357-68
115. Chevrier S, Crowell HL, Zanutelli VRT, Engler S, Robinson MD, Bodenmiller B. 2018. Compensation of Signal Spillover in Suspension and Imaging Mass Cytometry. *Cell Syst* 6:612-20 e5

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stufentherapie bei atopischer Dermatitis. ....	5
Abbildung 2: Gestörte Epithelbarriere und Immunantwort bei AD-Patienten. ....	7
Abbildung 3: Einteilung der Leukozyten. ....	9
Abbildung 4: Vermehrte Eosinophilenfrequenzen in Blut und Haut bei AD. ....	10
Abbildung 5: Identifikation einzelner T-Zellpopulationen. ....	12
Abbildung 6: Differenzierung der CD4 <sup>+</sup> -Gedächtnis-T-Zellen. ....	13
Abbildung 7: Funktionsprinzip des CyTOF-Instruments. ....	16
Abbildung 8: Erhebung des SCORADs. ....	19
Abbildung 9: Überblick über Ablauf der Untersuchung. ....	21
Abbildung 10: Prozessierung der Daten. ....	27
Abbildung 11: Donoridentifikation aus Gesamtdaten. ....	28
Abbildung 12: Statistisches Vorgehen. ....	29
Abbildung 13: Auswertung zur Datenrückgewinnung bei Verwendung des CD45- Barcodings. ....	32
Abbildung 14: Normalisierung der CyTOF-Daten. ....	33
Abbildung 15: Nicht-supervidierte Cluster-Analyse von Blutimmunzellen bei AD. ....	35
Abbildung 16: Erhöhte Eosinophilenfrequenz im Blut von Patienten mit AD. ....	36
Abbildung 17: Erniedrigte Frequenzen von CD56dim NK-Zellen im Blut von Patienten mit AD und Expression von CD38 und CD69. ....	38
Abbildung 18: Identifikation von ILC2s. ....	40
Abbildung 19: T-Zellidentifikation und erhöhte HLADR-Signalstärke einer Subpopulation bei Patienten mit atopischer Dermatitis. ....	42
Abbildung 20: Th2-Zellen im Blut von AD-Patienten und Gesunden. ....	43
Abbildung 21: Identifikation von regulatorischen T-Zellen (Tregs). ....	44
Abbildung 22: Identifikation von B-Zellpopulationen. ....	45

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien nach Hanifin und Rajka. ....	4
---	---

Tabelle 2: Gegenüberstellung Massen- (CyTOF) und Durchflusszytometrie. ....	17
Tabelle 3: Antikörperliste.....	22
Tabelle 4: Materialliste.....	24
Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Untersuchungsgruppen.....	31
Tabelle 6: T-Zellfrequenzen im Blut von AD-Patienten und Gesunden.....	41
Tabelle 7: Frequenzen der regulatorischen T-Zellen bezogen auf Leukozyten. ....	44
Tabelle 8: Vergleichbare Frequenzen von B-Zellpopulationen im Blut von AD-Patienten und Gesunden. ....	46

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Valerie Glatzel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Identifikation pathogenetischer Immunzellen im Blut bei atopischem Ekzem (Allecytome) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

**Datum**

**Unterschrift**



## **Publikationsliste**

Valerie Glatzel hatte Anteil an den folgenden Vorträgen/ Postern:

Vortrag 2nd Students' Day of the SFB 650 Integrated Research Training Group:  
Comparison of Immune Cells in Patients with Atopic Dermatitis and Healthy Donors Using Mass Cytometry

Valerie Glatzel

CYTO 2018 Prag: High-dimensional immune cell profiling in atopic dermatitis: more than a Th2 response?

Sabine Baumgart, Valerie Glatzel, Till-Antoni Sörensen, Thomas Häupl, Henrik E Mei, Margitta Worm, Andreas Grützkau, Guido Heine

CyTOF User Forum 2018: A Statistical Approach of Estimating the Number of Clusters in SOM-clustering for CyTOF Data

Till-Antoni Sörensen, Pascal Schendel, Sabine Baumgart, Andreas Grützkau, Henrik E Mei, Valerie Glatzel, Margitta Worm, Guido Heine, Thomas Häupl

31. Mainzer Allergie Workshop 2019: Exploring the immune profile of atopic dermatitis by mass cytometry (CyTOF)

Valerie Glatzel, Sabine Baumgart, Till-Antoni Sörensen, Thomas Häupl, Henrik Mei, Andreas Grützkau, Margitta Worm, Guido Heine

**"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."**

**"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."**

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. Guido Heine für die gute wissenschaftliche und akademische Betreuung. Auch danke ich Frau Prof. Dr. med. Worm sowie den Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe für die Unterstützung. Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunmonitoring und dort besonders Dr. rer. nat. Andreas Grützkau, Dr. rer. nat. Sabine Baumgart und Anette Peddinghaus für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, die gute Einarbeitung, Beratung und tägliche Unterstützung im Labor danken. Ich möchte mich auch bei Dipl.-math. Till-Antoni Sörensen für seine Unterstützung bei der Analyse der Daten bedanken.