

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

DISSERTATION

**IL-24 ist ein häufiges und spezifisches IgE-Autoantigen bei Patienten
mit chronisch spontaner Urtikaria**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Fatih Alexander Topal

aus Berlin

Datum der Promotion: 06.09.2019

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Journal of Allergy and Clinical Immunology / 5. Dezember 2017; S0091-6749(17)31875-4.

IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticarial. Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, Maurer M.

Liste der eigenen Anteile in der Vorpublikation:

- Entwicklung eine Sandwich-ELISAs und Messung von Seren von Patienten mit chronisch spontaner Urtikaria und von gesunden Kontrollen.
- Protein-Microarray Messungen bei Patienten mit chronisch spontaner Urtikaria, idiopathischer Anaphylaxie und gesunden Kontrollen

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	8
Zusammenfassung.....	9
Summary	11
1. Einleitung.....	13
1.1 Chronisch spontane Urtikaria.....	13
1.2 CSU und andere Autoimmunerkrankungen.....	14
1.3 CSU und psychische Komorbiditäten	15
1.4 Subtypen der chronischen Urtikaria	15
1.5 Die Mastzelle.....	16
1.6 Autoimmunität als Pathomechanismus.....	17
1.7 Klinische Manifestation von Urtikaria	18
1.8 Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay	19
1.9 Das Protein-Microarray.....	21
1.10 Zielsetzung.....	22
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Materialien	24
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission.....	26
2.2.2 Seren aus dem Blut von Patienten mit CSU und aus gesunden Probanden.....	26
2.2.3 “Urticaria Activity Score UAS7”	26

2.2.4 Detektion von potenziellen Autoantigenen mittels Protein-Microarray.....	28
2.2.5 Messungen von IgE-anti-IL24 mittels Sandwich-ELISA	28
2.2.6 Bestimmungen der IgE-anti-IL-24 Einheiten	30
2.2.7 Bestimmung der basophilen Zellen.....	30
2.2.8 Bestimmung des Anti-HBs-AK-Titers.....	30
2.2.10 Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS).....	31
2.2.11 Statistische Auswertungen.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Das IgE von Patienten mit CSU bindet viele Autoantigene	33
3.2 IL-24 ist ein CSU-spezifisches IgE-Autoantigene in der Haut	33
3.3 IgE-anti-IL-24 ist das am häufigsten vorkommende IgE-Autoantigene in Patienten mit CSU	35
3.4 Das Autoantigen IgE-anti-IL-24 ist ein sensitiver und spezifischer Marker für CSU	36
3.5 Hohe IgE-anti-IL-24 Serumwerte korrelieren mit der CSU Krankheitsaktivität	39
3.6 Hohe relative IgE-anti-IL-24 Serumwerte sind mit niedrigeren basophilen Zellen assoziiert.....	39
3.7 CSU-Patienten mit Hepatitis-B Schutzimpfung haben niedrigere IgE-anti-IL-24 Werte	41
3.8 Hohe IgE-anti-IL-24 Werte korrelieren mit niedrigeren HADS-Scores.....	42
3.9 Hohe Triiodthyronin Serumwerte sind mit niedrigen IgE-anti-IL-24 assoziiert	43
3.10 Keine signifikanten Unterschiede in der Alters- und Geschlechterverteilung.....	44
4. Diskussion.....	45
4.1 Übersicht der Ergebnisse	45
4.2 Die Detektion von Autoantigenen.....	45
4.3 IL-24 als potenzielles Autoantigen	46
4.4 Die Funktion des IL-24.....	46
4.5 IgE gegen das Schilddrüsenenzym Thyreoperoxidase	47

4.6 Autoimmunität als Pathomechanismus	48
4.7 Krankheitsaktivität und basophile Zellen	48
4.8 Hepatitis-B-Impfung und CSU	49
4.9 Ängstlichkeit und Depressionen bei CSU	49
4.10 Hohe Triiodthyronin Serumwerten sind mit niedrigen IgE-anti-IL-24 assoziiert	50
4.11 Anti-IgE als Therapieoption	50
4.12 Stärken und Schwächen der Arbeit	51
4.13 Zusammenfassung und Ausblick	52
Literaturverzeichnis	53
Eidesstattliche Erklärung	59
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	60
Lebenslauf	61
Publikationsliste	62
Publikationen	62
Abstracts	62
Danksagung	63

Abkürzungsverzeichnis

Aab	<u>a</u> uto <u>a</u> nti <u>b</u> ody
Aag	<u>A</u> uto <u>a</u> ntigen
Aak	<u>A</u> uto <u>a</u> nti <u>k</u> örper
aAIU	<u>a</u> kute <u>A</u> spirin- <u>I</u> ntoleranz <u>U</u> rtikaria
Ag	<u>A</u> ntigen
Anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatitis-B surface Antigen
Ak	<u>A</u> nti <u>k</u> örper
aTPO	<u>a</u> nti- <u>T</u> PO; Thyreoperoxidase-Antikörper
BSA	„ <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin“; Rindereiweiß
BHHCT	4,4''-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafluoro-1,3-dioxohexyl)-o-terphenyl-4'-sulfonyl chloride
Ca ⁺	„ <u>C</u> alcium“; Kalzium
cAIU	<u>c</u> hronische <u>A</u> spirin- <u>I</u> ntoleranz <u>U</u> rtikaria
CD	„ <u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation“; Unterscheidungsgruppe
CD31	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
CD34	Oberflächenprotein und Zelladhäsionsmolekül
CD147	Basigin; “extracellular matrix metalloproteinase inducer”
CIU	<u>c</u> hronisch <u>i</u> nduzierbare <u>U</u> rtikaria
CSU	<u>c</u> hronisch <u>s</u> pontane <u>U</u> rtikaria
CU	<u>c</u> hronische <u>U</u> rtikaria
ELISA	„ <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay“
FcεRI	aus der Gruppe der Fc-Rezeptoren, hochaffiner IgE-Rezeptor
FcεRII	CD23; aus der Gruppe der Fc-Rezeptoren, niedrigaffin
HADS	“ <u>H</u> ospital <u>A</u> nxiety and <u>D</u> epression <u>S</u> cale”
HTH	<u>H</u> ashimoto <u>T</u> hyroiditis
idA	<u>i</u> diopathische <u>A</u> naphylaxie
IgE	<u>I</u> mmunoglobulin <u>E</u>
IgE-anti-IL-24	IgE-Autoantikörper gegen IL-24
IgG	<u>I</u> mmunoglobulin <u>G</u>
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin

LCK	<u>L</u> anthanoid- <u>C</u> helat <u>k</u> omplexe
N	n; Anzahl der Fälle/Patienten/Probanden
NSAR	<u>N</u> icht <u>s</u> teroidales <u>A</u> ntir <u>r</u> heumatikum
MMP	<u>M</u> atrix- <u>M</u> etallo <u>p</u> roteinase
p	Angabe der Signifikanz
PAF	<u>P</u> lättchen <u>a</u> ktivierender <u>F</u> aktor
PBS	„ <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline“; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMA	<u>P</u> rotein- <u>M</u> icro <u>a</u> rray; Protein-Chip
QoL	„ <u>Q</u> uality <u>o</u> f <u>l</u> ife“; Lebensqualität
ROC-Kurve	„ <u>R</u> eceiver- <u>O</u> perating- <u>C</u> haracteristic-Kurve“; Grenzwertoptimierungskurve
sIL-24	Isoform von IL-24
TH2-Zellen	Subgruppe einer T-Helferzelle
TNF- α	<u>T</u> umornekrosefaktor α
TPBS	<u>T</u> ween- <u>P</u> BS
TPO	<u>T</u> hyreoperoxidase
UAS	<u>U</u> rtikaria <u>A</u> ktivitätsscore
UAS7	<u>U</u> rtikaria <u>A</u> ktivitätsscore über 7 Tage
VEGF	„ <u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor“; Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typ I und Typ IIb Autoimmunität	18
Abbildung 2: Die häufigsten ELISA-Formate (direkte und indirekte Assays)	20
Abbildung 3: Funktionsweise eines Protein-Microarrays	22
Abbildung 4: Sandwich-ELISA Funktionsweise (modifiziert).....	29
Abbildung 5: Selektionsprozess von Interleukin-24 (IL-24) als spezifisches, in der Haut gebildetes und von IgE detektiertes Aag bei CSU-Patienten	34
Abbildung 6: Anzahl der gefundenen Autoantigene bei Patienten mit CSU, idA und bei gesunden Kontrollen	35
Abbildung 7: IgE-anti-IL-24-Werte sind bei CSU-Pateinten höher als bei Kontrollen.....	37
Abbildung 8: Korrelation von IgE-anti-IL-24 mit CSU Krankheitsaktivität.....	38
Abbildung 9: Hohe relative IgE-anti-IL-24 Serumwerte korrelieren mit niedrigeren basophilen Zellen.	39
Abbildung 10: Korrelation IgE-anti-IL-24/Gesamt-IgE-Verhältnis mit UAS gruppiert.....	40
Abbildung 11: Korrelation zwischen IgE-anti-IL-24 und Anti-HBs-Antikörpern	41
Abbildung 12: Korrelation zwischen IgE-anti-IL-24 und Depression/Ängstlichkeit	42
Abbildung 13: Höhere T3 Serumwerten sind mit niedrigerem IgE-anti-IL-24 assoziiert	43
Abbildung 14: Altersverteilung CSU-Patienten und gesunde Kontrolle	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Empfohlene Aufteilung der Urtikaria nach der neuen S3-Leitlinie 2018 (6).....	15
Tabelle 2: Hauterscheinung der Urtikaria, modifiziert nach (6)	19
Tabelle 3: „Urticaria Activity Score UAS“ zur Einschätzung der Krankheitsaktivität (6).....	27
Tabelle 4: “Urticaria Activity Score UAS7” über 7 Tage (6).....	27
Tabelle 5: “Hospital Anxiety and Depression Scale” (HADS) (46)	31
Tabelle 6: Alters- und Geschlechterverteilung.....	44

Zusammenfassung

Einführung

Die Ursachen der chronisch spontanen Urtikaria (CSU) sind noch nicht endgültig geklärt. Es ist beschrieben, dass bei der Entstehung der CSU Immunglobulin E (IgE) Autoantikörper (Aak) involviert sind. Um die Ursachen der CSU besser zu verstehen, wurden Patienten mit CSU, mit idiopathischer Anaphylaxie (idA) und gesunde Kontrollen auf potenzielle IgE-Autoantigene (Aag) mittels Protein-Microarray (PMA) durchsucht und mittels ELISA gemessen.

Methoden

Von dem Gesamtkollektiv wurden zunächst jeweils sieben Seren von Patienten mit CSU, sieben mit idA und sieben gesunde Kontrollen mittels eines PMA mit mehr als 9000 humanen Proteinen auf IgE-Aag untersucht. Insgesamt wurden im Anschluss 1062 CSU Patientenserum und 482 Seren von gesunden Probanden auf IgE-anti-IL-24 analysiert. Die IgE-anti-IL-24-Serumwerte wurden mithilfe eines entwickelten, IgE-anti-IL-24 spezifischen, ELISAs gemessen. Krankheitsspezifische Daten wurden mittels Fragebögen „Urtikaria Aktivitätsscore 7“ (UAS7) und „Hospital Anxiety and Depression Scale“ (HADS) erfasst, sowie mittels Messung der basophilen Zellen im Blut. Die ELISA Ergebnisse wurden mit den klinischen Daten verglichen.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 226 IgE-Aag bei Patienten mit CSU gefunden, bei idA-Patienten 161 und bei gesunden Probanden 34 Aag. In mehr als 70% der Patienten konnten 31 IgE-Aag detektiert werden, acht davon waren lösliche oder membrangebundene Proteine und in der Haut exprimiert. Von diesen acht IgE-Aag hatte das IL-24, mit einem prozentualen Anteil von 1,1% (relativ zum gemessenen Gesamt-IgE) die höchste Konzentration bei allen CSU-Patienten. Eine Korrelation zwischen dem IgE-anti-IL-24-Gesamtwert und dem Gesamt-IgE im Serum konnte nicht gezeigt werden ($r = 0,002$, $p = 0,840$). Die mittels ELISA gemessenen CSU-Seren zeigten 2,2-fach höhere IgE-anti-IL-24-Werte ($0,52 \text{ IU/mL} \pm 0,24$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($0,27 \text{ IU/mL} \pm 0,08$, $p = 0,001$). 80% der CSU-Seren (874 von 1062) zeigten höhere IgE-anti-IL-24-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit 20% (99 von 482; $p < 0,0001$). Hohe IgE-anti-IL-24-Serumwerte korrelierten mit der CSU-Krankheitsaktivität (UAS7) und mit niedrigen

Werten für basophile Zellen im Blut. CSU-Patienten mit hohen anti-HBs-Werten und mit hohen Triiodthyronin-Werten hatten niedrige IgE-anti-IL-24-Serumwerte. Hohe IgE-anti-IL-24-Serumwerte gingen mit niedrigen HADS-Ergebnissen einher. Die Populationen zeigten keine signifikanten Unterschiede bei der Alters- und Geschlechterverteilung.

Schlussfolgerung

CSU-Patienten haben IgE-Aak gegen diverse Aag. Das IL-24 ist ein häufiges und spezifisches IgE-Aag bei Patienten mit CSU. Hohe IgE-anti-IL-24-Serumwerte korrelieren mit hoher CSU-Krankheitsaktivität. In Zukunft könnten neue Arrays zur Messung von autoreaktivem IgE, im Speziellen von IgE-anti-IL-24, etabliert werden. Dies könnte dabei helfen, die Patienten mit CSU besser zu erkennen und effektivere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Summary

Background

Up to now, the causes of chronic spontaneous urticaria (CSU) haven't been conclusively determined. Immunoglobulin E (IgE) autoantibodies (Aab) seem to play an important role in CSU's emergence. To understand the pathogenesis of CSU in more detail, CSU-patients, patients with idiopathic anaphylaxis (idA) and healthy control subjects were screened for potential IgE-autoantigens (Aag) with protein-microarray (PMA) and measured with ELISA.

Methods

In total, 1,062 sera from patients with CSU and 482 sera from control subjects were collected. Seven sera of each from the CSU-patients, from idA patients and control subjects were analyzed using a PMA with more than 9,000 human proteins to screen for IgE-Aag. IgE-anti-IL-24 serum levels were measured with a developed, IgE-anti-IL-24-specific ELISA. Disease-specific data were documented in "Urticaria Activity Score 7" and "Hospital Anxiety and Depression Scale" (HADS) questionnaires, as well as measurement of basophilic cells in the blood. The ELISA results were compared with clinical data.

Results

In total, 226 IgE-Aag were found in CSU-patients, 161 in idA-patients and 34 in controls. In over 70% of the patients, 31 IgE-Aag were detected, eight of them were soluble or membrane bound and expressed in skin. Among these eight IgE-Aag, IL-24 had the highest concentration of all CSU-patients of 1.1% (relative to total IgE). No correlation was found between the total IgE-anti-IL-24 level and the serum total IgE level ($r = 0.002$, $p = 0.840$). CSU-patients' serum measured with ELISA showed IgE-anti-IL-24 levels that were 2.2 times higher ($0.52 \text{ IU/mL} \pm 0.24$) compared to control subjects ($0.27 \text{ IU/mL} \pm 0.08$; $p = 0.001$). 80% of CSU-patients' sera (874 of 1,062) had higher IgE-anti-IL-24 levels compared to controls with 20% (99 of 482; $p < 0.0001$). High IgE-anti-IL-24 levels correlate with CSU disease activity (UAS7) and low levels of basophilic cells in the blood. CSU-patients with high anti-HBs levels and high Triiodothyronin levels had low IgE-anti-IL-24 levels. High IgE-anti-IL-24 levels in sera were associated with low HADS scores. The populations didn't show any significant differences in age and gender distribution.

Conclusion

CSU-patients have IgE-Aab against various Aag. In our population, IL-24 was a common and specific IgE-Aag in CSU-patients. High IgE-anti-IL-24 serum levels correlate with CSU disease activity. In the future, new arrays can be established to measure autoreactive IgE, especially anti-IL-24. Our results could improve the identification of CSU-patients and may help to develop more effective and specific treatments.

1. Einleitung

1.1 Chronisch spontane Urtikaria

Die Urtikaria, im deutschen Sprachgebrauch auch als Nesselsucht bekannt, ist eine mastzellvermittelte Erkrankung, die klinisch mit Quaddeln (Nesselausschlag), Juckreiz und/oder mit Angioödem einhergehen kann (5). Die pathogenetischen Mechanismen sind größtenteils noch unklar. Die Lebenszeitprävalenz für die akute Urtikaria beträgt 20% (6). Die Klassifikation der Urtikaria erfolgt nach der Ursache und nach dem klinischen Erscheinungsbild (6). Bestehen die rezidivierenden Quaddeln und/oder Angioödem länger als sechs Wochen, handelt es sich um eine chronische Urtikaria (CU), bei unter sechs Wochen spricht man von einer akuten Urtikaria (6). Die CU kann induziert oder nicht-induziert auftreten (6). Die chronisch induzierbare Urtikaria (CIU) wird sowohl physikalisch als auch nicht-physikalisch getriggert - d. h. die Symptomatik wird durch bestimmte physikalische Reize wie Kälte oder Wärme oder durch nicht-physikalische Reize wie Nahrungs- und Arzneimittel getriggert (7). Ist die Ursache für die Urtikaria unbekannt bzw. nicht durch Reize oder Substanzen induzierbar, spricht man von einer chronisch spontanen Urtikaria (CSU) (7). Die Prävalenz für die CSU lag bei einer in Italien durchgeführten Studie zwischen 0,02% in 2002 bis 0,38 in 2013 und die Inzidenz bei 0,10 – 1,50 pro 1000 Personenjahre (8). Bei mehr als dreiviertel der Patienten, die an CSU erkrankt sind, kann keine direkte Ursache ermittelt werden (9). Die Pathomechanismen sind noch nicht komplett erforscht, jedoch scheinen autoallergische Mechanismen und pseudoallergische Reaktionen (nicht-allergische Hypersensitivität) auf NSAR und auf Nahrungsmittel die Entstehung von CSU zu triggern. Die Studien von Kolkhier et al. (10) zeigten außerdem, dass Mechanismen einer Typ 1 und Typ 2 Autoimmunität eine Rolle bei der Entstehung von CSU spielen (6, 10). Auch bakterielle (11), virale (12) und parasitäre (13, 14) Infektionen tragen zur Entwicklung einer CSU bei (15). Die Wirksamkeit von H₁-Antihistaminika (16), die erhöhten Immunglobulin E (IgE) Antikörper (Ak) Werte in Patientenserum, die Wirksamkeit von Omalizumab (anti-IgE) (17) sowie das Fehlen von exogenen Allergenen sprechen dafür, dass es sich bei der CSU um eine mastzellvermittelte Reaktion handelt, jedoch nicht im Sinne einer Typ 1 Hypersensitivität gegen körpereigene Antigene (Ag).

1.2 CSU und andere Autoimmunerkrankungen

CSU Patienten weisen im Serum erhöhte IgE-Werte gegen das Schilddrüsenantigen Thyreoperoxidase (TPO) auf (18-21). Beobachtungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die CU assoziiert ist mit einer Hypothyreose, ausgelöst durch Hashimoto Thyreoiditis (HTH). Das Risiko, an einem Angioödem zu leiden steigt, wenn Patienten mit einer CIU zusätzlich an einer Autoimmunthyreopathie leiden (22, 23). Eine autoimmunvermittelte Erkrankung kann sowohl einzelne Organe betreffen, wie z. B. bei der HTH, oder sie kann systemisch sein wie bei einer CSU. In verschiedenen Studien zeigten ca. 10% - 30% der CU-Patienten Anti-Thyroid-Ak im Blut (23).

Eine HTH entsteht nach Zerstörung der Thyroidzellen durch Autoantikörper (Aak) vermittelte immunologische Prozesse. Die Zerstörung der Thyroidzellen führt zur Fibrosierung des Schilddrüsenorgans mit Funktionsverlust. In den entwickelten Ländern ist die autoimmunvermittelte Hypothyreose die häufigste Ursache. Weltweit betrachtet ist der Jodmangel die häufigste Ursache einer Hypothyreose (24).

In den Laborparametern zeigt sich eine HTH durch die Erhöhung des Thyreoidea-stimulierenden Hormon (TSH), der Erniedrigung des Thyroxin-(T₄; 3,3',5,5'-Tetraiod-L-Thyronin)-Wertes und durch den Nachweis von Ak gegen die Thyreoperoxidase (TPO). Frauen sind häufiger von der HTH betroffen als Männer (Verhältnis 10:1). Die Therapie erfolgt durch die Substitution von Levothyroxine (T₄). Das T₄ wird in die aktivere Form Triiodthyronin (T₃) umgewandelt (24).

Die CSU ist nicht nur mit autoimmuner Thyreoiditis assoziiert; die Patienten mit CSU haben ein erhöhtes Risiko, an weiteren autoimmunvermittelten Erkrankungen (wie z.B. systemischen Lupus erythematodes) zu leiden (25, 26). Bei Urtikaria-Patienten können autoreaktive IgE-Ak an körpereigene Ag, wie z. B. an die Doppelstrang-DNS, binden und die mastzellvermittelte Ausschüttung von Histamin induzieren (27). IgE-Ak und Mastzellrezeptoren (FcεRα-Rezeptoren) können als Ag erkannt und durch zirkulierende Aak der Klasse Immunglobulin G (IgG) gebunden werden. IgG-Aak können zur Quervernetzung von IgE führen und stimulieren die Mastzellen zusätzlich, obwohl keine exogenen Allergene vorliegen (28, 29).

1.3 CSU und psychische Komorbiditäten

Ob die CSU durch psychosozialen Faktoren getriggert werden kann oder bei der Entwicklung einer CSU maßgeblich eine Rolle spielen, ist aus der aktuellen Datenlage heraus nicht eindeutig belegt. Es gibt jedoch Hinweise, dass ca. 41 – 48 % der CSU-Patienten zusätzlich psychische Störungen aufweisen (30, 31). Patienten mit CSU können zusätzlich Angststörungen, Depressionen oder somatoforme Störungen haben, die zu emotionalem Stress führen können (31). Die mittels Fragebögen erfasste Lebensqualität (QoL) ist bei CSU-Patienten häufig deutlich herabgesetzt (32). Aus diesem Grund ist es wichtig, dass Patienten mit CSU auf eventuelle zusätzliche psychische Komorbiditäten untersucht werden und entsprechend interdisziplinär betreut werden.

1.4 Subtypen der chronischen Urtikaria

Tabelle 1: Empfohlene Aufteilung der Urtikaria nach der neuen S3-Leitlinie 2018 (6)	
Chronisch spontane Urtikaria (CSU)	Induzierbare Urtikaria
Spontane Entwicklung von Quaddeln, Angioödemem oder beides für > 6 Wochen aufgrund einer bekannten ¹ oder unbekanntem Ursache	Symptomatischer Dermographismus Dermographische Urtikaria ² Verzögerte Druckurtikaria ³ Kälteurtikaria ⁴ Lichturtikaria Wärmeurtikaria ⁵ Vibrationsurtikaria Cholinerge Urtikaria ⁶ Kontakturtikaria Aquagene Urtikaria
¹ Autoreaktivität, d. h. Anwesenheit von Mastzellaktivierenden Auto-Antikörpern; ² auch Urticaria factitia genannt; ³ auch Urticaria factitia tarda; ⁴ auch Kältekontakturtikaria; ⁵ auch Wärmekontakturtikaria; ⁶ auch Anstrengungsurtikaria; Abbildung modifiziert nach (6).	

1.5 Die Mastzelle

Die Mastzelle spielt eine entscheidende Rolle bei der IgE-vermittelten Entstehung von Typ-1-Allergien. Die Aktivierung von Mastzellen und die Ausschüttung von Histamin erfolgt über Allergene durch Quervernetzung von IgE-Ak, die an die hochaffinen FcεRI-Rezeptoren gebunden sind. Mastzellen sind wie basophile Zellen reich an Granula, gefüllt mit sauren Proteoglykanen, die sich mit basischen Färbungen histologisch darstellen lassen. Die Mastzellen und basophilen Zellen haben eine ähnliche Zusammensetzung von Mediatoren. Mastzellen sind hoch spezialisierte Zellen, die häufig im Epithelgewebe, in der Schleimhaut, in der Nähe von kleinen Blutgefäßen und postkapillaren Venolen vorkommen. Auch in subendotheliales Bindegewebe kommen Mastzellen vor. Werden in der Haut Ag gebunden und durch antigenpräsentierende Zellen über MHC-Klasse-II-Komplex präsentiert, werden sie von T-Helferzellen (CD4+ Zellen) erkannt. Die T-Helferzellen aktivieren durch weitere Signalwege die B-Zellen und fördern die Differenzierung der B-Zellen in Plasmazellen. Plasmazellen produzieren die IgE-Ak. Mastzellen besitzen auf ihren Oberflächen zahlreiche FcεRI-Rezeptoren. An diese Rezeptoren sind die IgE-Ak gebunden, die von Plasmazellen freigesetzt werden. Gelangt ein Ag nach der Sensibilisierungsphase ein zweites Mal in den Körper, binden sie an die IgE-Ak und führen zur Quervernetzung dieser. Durch die Stimulierung der Rezeptoren kommt es zum intrazellulären Ca⁺-Anstieg und innerhalb von wenigen Sekunden zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Unter den Entzündungsmediatoren befindet sich auch das Histamin – ein vasoaktives Amin, das unmittelbar den Blutfluss und die Gefäßpermeabilität steigert und zum Flüssigkeitsaustritt ins Interstitium führt. Darüber hinaus werden auch Enzyme wie Chymosin, Trypsasen und Serin-Esterasen freigesetzt. Durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen wird zusätzlich das Gewebe zerstört. Auch große Mengen von Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) wird durch die Mastzelle freigesetzt. Das TNF-α aktiviert Endothelzellen und führt zur vermehrten Expression von Bindungsproteinen. Die Bindungsproteine locken Leukozyten und Lymphozyten in das Gewebe, die die Entzündung weiter fördern (33).

Die aktivierten Mastzellen schütten zusätzlich Chemokine, Leukotriene und plättchenaktivierende Faktoren (PAF) aus. Zytokine wie das IL-4 und IL-13 erhalten die humorale T-Zell-Antwort (TH2-Antwort) aufrecht und führen zur akuten und zur chronischen

Entzündungsreaktion im Gewebe. Die Mastzellen sind durch Rekrutierung von weiteren eosinophilen und basophilen Zellen sowie von TH2-Lymphozyten die Hauptakteure der IgE-vermittelten Entzündungsreaktion. Dieser Mechanismus dient physiologisch zur Abwehr von verschiedenen Infektionen. Die mastzellvermittelte akute und chronische Entzündungsreaktion hat pathophysiologische Konsequenzen. So entstehen neben Allergien auf verschiedene Ag aus der Umwelt auch chronische Erkrankungen, wie z. B. die CSU getriggert durch Autoimmunreaktionen (33).

1.6 Autoimmunität als Pathomechanismus

Die Autoimmunität ist neben Infektionen und Nahrungsmittelunverträglichkeiten eine weitere und häufige Ursache bei der Entstehung einer CSU (6). In diesem Fall erfolgt die Mastzellaktivierung über eine Typ I oder eine Typ II Hypersensibilität nach Coombs und Gell (Abbildung 1) (34). Aak erkennen fälschlicherweise körpereigene Ag und führen, wie weiter oben beschrieben, über verschiedene Mediatoren und Signalkaskaden zu einer entzündlichen Reaktion in der Haut.

Bei einer Hypersensibilität nach Typ I richten sich die IgE-Aak gegen körpereigene Ag, man spricht auch von einer Autoallergie. Die IgE-Aak werden durch Autoantigene (Aag) quervernetzt. Die quervernetzten IgE-Aak aktivieren schließlich über hochaffine FcεRI-Rezeptoren die Mastzellen und die basophilen Zellen (10).

Bei einer Hypersensibilität nach Typ II richten sich IgG-Aak gegen IgE-Ak und führen so zur Quervernetzung der IgE-Ak. Die quervernetzten IgE-Ak binden wie bei einer Autoantigenerkennung an die hochaffinen FcεRI-Rezeptoren und aktivieren die Mastzellen sowie die basophilen Zellen. Die IgG-Aak können auch direkt die zellmembranständigen hochaffinen FcεRI-Rezeptoren (Mastzellen und basophile Zellen) oder niedrig affinen FcεRII-Rezeptoren (eosinophile Zellen) binden und zur Aktivierung dieser Zellen führen (10).

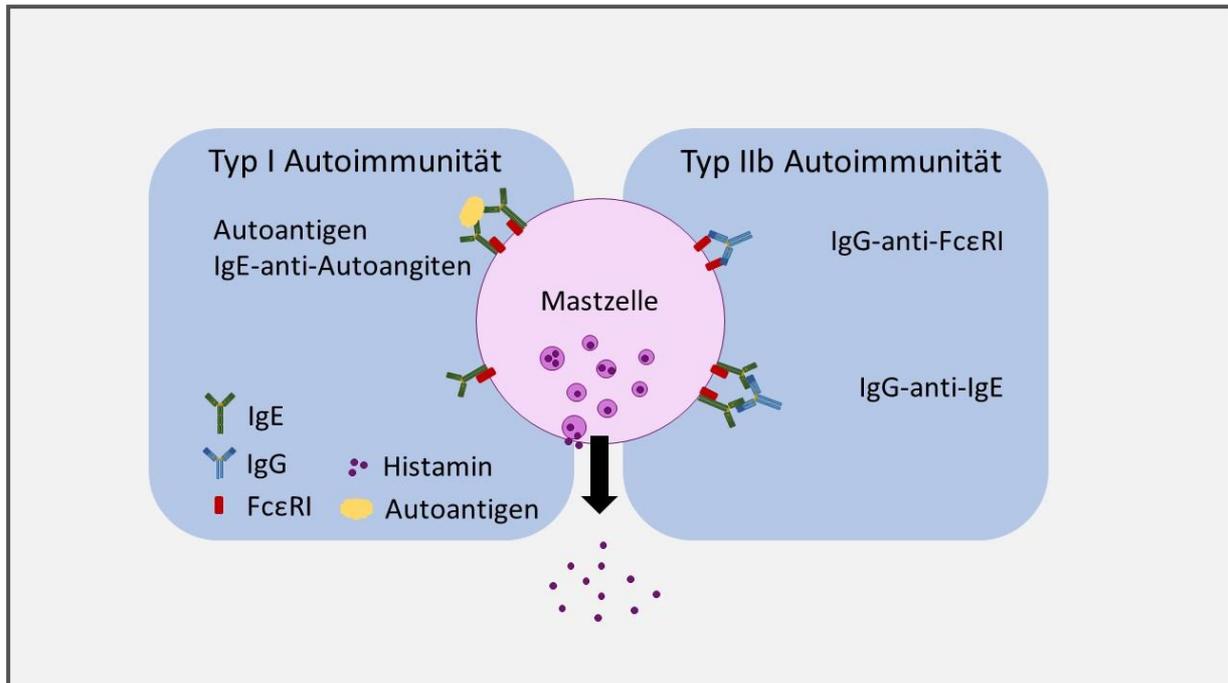


Abbildung 1: Typ I und Typ II Autoimmunität

Mastzellaktivierung bei Patienten mit CSU. Typ I Autoimmunität: Aag können IgE-Aak quervernetzen und Mastzellen bzw. basophile Zellen aktivieren. Typ II Autoimmunität: IgG-Aak können ebenfalls an IgE-Aak oder direkt an FcεRI binden und Mastzellen bzw. basophile Zellen aktivieren; Abkürzungen: Aag: Autoantigen; Aak: Autoantikörper, IgE: Immunoglobulin E, IgG: Immunoglobulin G; Abbildung modifiziert nach (3).

1.7 Klinische Manifestation von Urtikaria

Die Urtikaria ist eine mastzellvermittelte Erkrankung. Die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen durch die Mastzellen führt über die Stimulation von sensorischen Nervenzellen zur Vasodilatation und zur Steigerung der Gefäßpermeabilität. Die Permeabilität postkapillärer Venolen und der Lymphgefäße führt zum Austritt von freier Flüssigkeit aus den Gefäßen in den Extravasalraum und zur Ödembildung in der höheren und mittleren Dermis. Klinisch zeigen sich die typischen urtikariellen Quaddeln (33).

Die Angioödeme können einzeln oder zusammen mit Quaddeln auftreten. Die Pathogenese des Angioödems ist ähnlich wie bei den Quaddeln. Die Ödembildung findet in diesem Fall in den tieferen Hautschichten, in der tieferen Dermis und in der Subkutis, statt. Das Angioödem zeigt sich als tiefe, brennende, schmerzhaft, ödematöse Schwellung der Kutis und der Subkutis und/oder der Mukosa und Submukosa (6, 33).

Tabelle 2: Hauterscheinung der Urtikaria, modifiziert nach (6)	
Quaddel	Angioödem
Plötzlich beginnende Rötung und Schwellung der höheren und mittleren Dermis	Plötzlich beginnende Schwellung der tiefen Dermis und Subkutis. Die Haut ist nicht gerötet
Juckreiz und Brennen	Kein Juckreiz und Brennen
Rückbildung innerhalb von wenigen Stunden bis 24 Stunden	Rückbildung dauert länger - bis zu 72 Stunden

Die betroffenen Hautstellen von Patienten mit chronisch spontaner Urtikaria weisen eine vermehrte Bildung von endothelialen Bindungsproteinen, Neuropeptiden und Wachstumsfaktoren aus (35). Zusätzlich sind die Stellen durch verschiedene Entzündungszellen perivaskulär infiltriert. Diese Infiltrate können aus neutrophilen, eosinophilen und basophilen Zellen sowie aus Makrophagen und T-Zellen bestehen (36-38). Auch die gesunden Hautstellen von Patienten mit chronisch spontaner Urtikaria (CSU) zeigen mikroskopisch eine höhere Dichte an Bindungsproteinen und eine vermehrte Infiltration durch Mastzellen und eosinophile Zellen (36). Weitere Studien mit Blutuntersuchungen bei CSU-Patienten zeigten ein Ungleichgewicht von Entzündungsmediatoren und eine chronisch systemische Entzündung der Haut. Entzündungsmediatoren wie IL-6 und CRP sind signifikant erhöht bei Patienten mit CSU im Vergleich zu gesunden Probanden (39). Auch IL-33 und IL-17 sowie Gerinnungsfaktoren, wie Faktor VIIa, Prothrombinfragment 1 + 2 und die D-Dimere waren bei Untersuchungen erhöht (39, 40). Zusammenfassend zeigt sich, wie komplex die Pathogenese der chronisch spontanen Urtikaria ist. Um die CSU besser verstehen zu können, müssen weitere Studien durchgeführt werden.

1.8 Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), auch unter dem Namen Enzym-Immunoassay (EIA) bekannt, ist ein plattenbasiertes Nachweißverfahren zur Detektion und Quantifizierung verschiedenen Substanzen, wie z. B. Peptiden, Proteinen, Ak und Hormonen. Das nachzuweisende Ag muss löslich in einer Flüssigkeit vorliegen, um mit dem Ak ein Komplex bilden zu können, der wiederum an ein Enzym gebunden ist. Die Detektion erfolgt über die

konjugierten Enzyme, die durch Ihre Aktivität und durch die Reaktion messbaren Substanzen bilden. Die ELISAs werden in 96-Wellplatten oder in 384-Wellplatten Polystyrol-Platten verwendet. Die Proteine und die Ak binden passiv an die Platte, die ungebundenen und unspezifischen Materialien können dann ausgewaschen werden. Das Nachweiß-Enzym kann entweder direkt mit dem primären Ak oder mit dem sekundären Ak, welcher den primären Ak erkennt, verknüpft werden (Abbildung 2). Eine Bindung an ein Protein, wie z. B. Streptavidin ist ebenfalls möglich, wenn der primäre Ak mit dem Biotin markiert ist. Die häufigsten Enzym-Markierungen erfolgen mittels Meerrettichperoxidase und alkalischer Phosphatase (AP), es können aber auch andere Enzyme verwendet werden. Für die Meerrettichperoxidase und die AP gibt es zahlreiche Substrate. Die Wahl der Substrate hängt davon ab, wie sensitiv das ELISA sein soll und welches Gerät zur Signalmessung verwendet werden soll (2, 41).

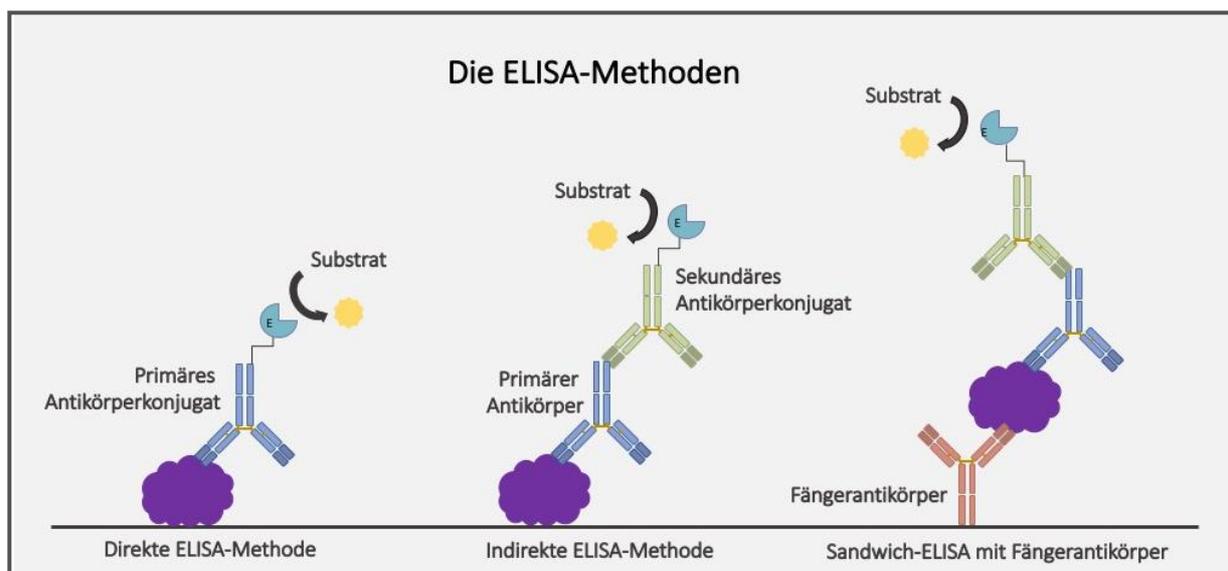


Abbildung 2: Die häufigsten ELISA-Formate (direkte und indirekte Assays)

Das zu untersuchende Ag ist entweder durch die direkte Bindung an die Assay-Platte immobilisiert oder es wird durch den Fänger-Ak gebunden und immobilisiert, der an die Platte gebunden ist. Die Detektion kann entweder durch die Nutzung konjugierter (enzymatisch) primärer Ak erfolgen (direkte Detektion) oder durch das Zusammenspiel nicht konjugierter primärer Ak und konjugierter sekundärer Ak (indirekte Detektion); Abkürzungen: Ag: Antigen; Ak: Antikörper; Abbildung modifiziert nach (2).

Das ELISA kann ausgehend vom Basisverfahren in verschiedenen Modifikationen genutzt werden. Das Ag von Interesse kann entweder über die direkte Bindung an die Assay-Platte oder über die indirekte Bindung via Fänger-Ak, welcher an die Platte gebunden ist, erfolgen. Das Ag kann dann entweder direkt mit einem primär markierten Ak oder indirekt mit einem markierten sekundären Ak detektiert werden. Eine weitere Möglichkeit, Ag zu detektieren, stellt das „Capture-Assay“, auch bekannt unter dem Namen „Sandwich“-ELISA, dar. Hierbei wird das Ag durch zwei primäre Ak, dem Fänger-Ak und dem markierten Nachweis-Ak abgefangen. Das „Sandwich“-ELISA ist eine sensitive und robuste Methode, Ag und Proteine zu detektieren (41).

Alternativ können die Ak mit fluoreszierenden Lanthanoiden detektiert werden. Das DELFIA® (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) ist eine Methode, bei der die Intensität der fluoreszierenden Lanthanoid-Chelatkomplexe (LCK) über ein zeitliches Intervall (TRF; time-resolved fluorescence) gemessen wird. Die Lanthanoide Europium (Eu), Termin (Tr), Samarium (Sa) sind für diese Technologie gut geeignet, da sie über einen längeren Zeitraum fluoreszieren können im Vergleich zu traditionellen Fluoreszenzfarbstoffen. Die große Stokes-Verschiebung und die engen Emissionsgipfel erhöhen das Signal-Rausch-Verhältnis. Je größer das Verhältnis ist, desto einfacher ist es, Informationen zu extrahieren. Außerdem ist die Sensibilität zusätzlich erhöht, weil die LCK von den Bindungsstellen dissoziieren und neue stark fluoreszierende Chelate bilden können in einer speziellen dafür vorgesehenen Lösung mit Mizellen. Die DELFIA LCK benötigen den Schritt der Dissoziation und die Fluoreszenzverstärkung. Die Dissoziation und Verstärkung kann durch DELFIA Verstärkerlösungen („enhancement solution“, DELFIA Enhancer) induziert werden (42).

1.9 Das Protein-Microarray

Die Funktionsweise eines Protein-Microarrays (PMA) ist ähnlich wie ein ELISA. Auf einem kleinen PMA befinden sich in dichter und fester Zuordnung mehrere immobile Proteine (bis zu 9000 Proteine). Nach Zugabe des Probenmaterials können die immobilisierten Proteine in Lösung direkt mit anderen Proteinen oder mit kleinen Molekülen interagieren (43). Durch den Waschvorgang können ungebundene Elemente entfernt werden. Das PMA ermöglicht das gleichzeitige Scannen von tausenden Proteinen auf biologische Interaktion innerhalb eines Tages. Aufgrund der kleinen Spots und der hohen Dichte der Proteine wird wenig

Probenmaterial benötigt. Mit Zugabe von Reagenzien können die Bindungsstellen mit einem Fluoreszenzscanner oder mit einem „Phosphorimager“ gelesen werden. Die Einsatzmöglichkeiten der PMA sind vielfältig. Sie können zu Forschungszwecken zur Identifikation von Biomarkern, Zielmolekülen bei Medikamenten, Enzym-Substrat-Interaktionen, Ak-Spezifität und Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden (Abbildung 3) (1).

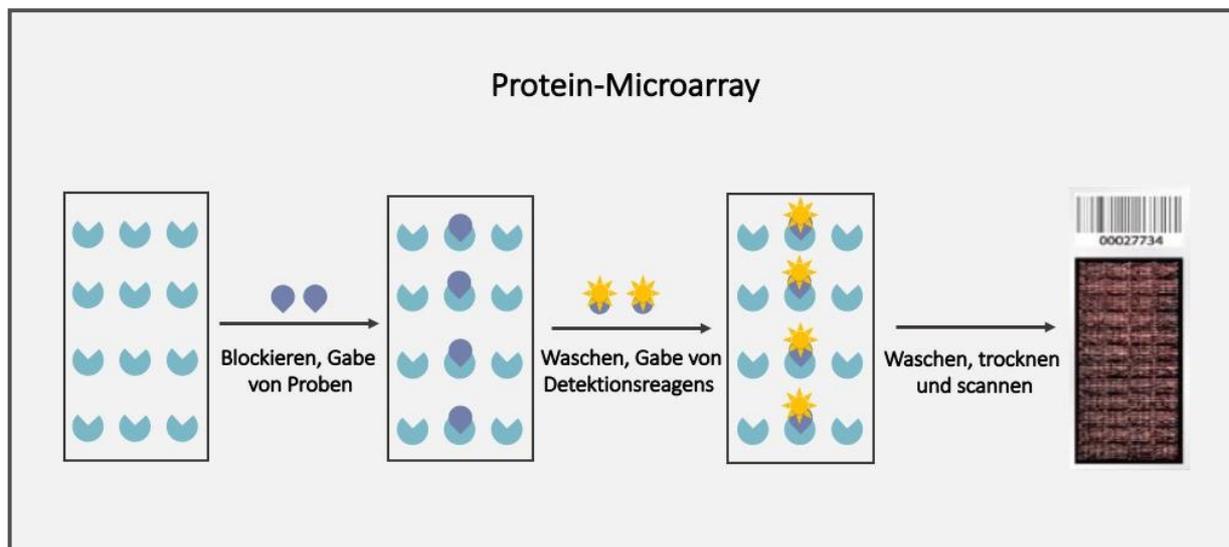


Abbildung 3: Funktionsweise eines Protein-Microarrays

Als erstes wird das Probenmaterial auf das PMA aufgetragen. Nach der Inkubation erfolgt der Waschvorgang, um überschüssiges Material zu entfernen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-Reagens gegeben und erneut inkubiert. Nach dem Waschvorgang kann der Chip trocken mit einem Scanner ausgewertet werden; Abkürzungen: PMA: Protein-Microarray; Abbildung modifiziert nach (1).

1.10 Zielsetzung

Ein Ansatzpunkt zum besseren Verständnis der CSU ist die genauere Betrachtung der autoimmunologischen Prozesse in der Pathogenese der Erkrankung. Verschiedene Studien zeigten bei der CSU eine Komorbidität zu anderen autoimmunvermittelten Erkrankungen (19, 26). Des Weiteren scheinen autoimmunologische Prozesse bei der spontanen Aktivierung von Mastzellen über Fc-Rezeptoren eine Rolle zu spielen (10, 44, 45). Exogenen Faktoren wie

Allergene oder physikalische Ursachen wie Kälte oder Wärme, die eine induzierbaren CU verursachen können, scheinen bei der CSU zu fehlen bzw. eine untergeordnete Rolle zu spielen. Aus diesem Grund suchten wir nach endogenen und autoreaktiven Mechanismen direkt in der Haut. Wir fokussierten auf potenzielle Aag, die spezifisch in der Haut von Patienten mit CSU exprimiert wurden und fähig waren, eine IgE-vermittelte spontane Aktivierung von Mastzellen zu triggern. Das gesuchte Ag sollte zudem extrazellulär und zugänglich für die Mastzellen sein. Das Finden von potenziellen Aag als mögliche Ursache für die Entstehung der CSU und die Möglichkeit, die Konzentration von den Aag im Patientenserum zu bestimmen, könnte uns helfen, die autoimmunologischen Pathomechanismen der CSU besser zu verstehen und neue Therapieoptionen zu entwickeln bzw. das Therapieansprechen besser zu überwachen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Folgende Materialien wurden für diese Arbeit verwendet:

Tabelle Lösungen/Proteine	
Beschichtungs-Puffer (ph9)	Sigma-Aldrich
Bindungsproteinen BHHCT	Sigma-Aldrich
DELFA „enhancer solution“	PerkinElmer
DTPA-purified BSA	PerkinElmer
EDTA	Hollborn & Söhne Herbeta
Ethanol (100%)	Herbeta
2% humanem Albumin	Baxter
TPBS	Sigma-Aldrich
TRIS-Acetat-EDTA Puffer	AppliChem

Antigene/Antikörper/Proteine	
Anti-Human-IgE (MHC18 Klon)	BioLegend
Human IL-24	Miltenyi Biotec GmbH
IgE-Allophycocyanin	BioLegend
IgE-anti-grün fluoreszierendem Protein	Bio-Rad
IgG-Phycoerythrin	BioLegend

Protein-Chip		
Protein-Microarray	Version 5.1	Terhmo Fischer Scientific

Verbrauchsmaterialien		
black NUNC Maxi-Sorb	384-Well-Platten	Thermo Fischer
Einmalkanülen	0,3 x 12 mm	Braun
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Röhrchen	10 ml, 50 ml	Falcon
Sterile serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	1000 µl	Biozym

Geräte		
CO2 Inkubator	Heracell150	Thermo Fischer Scientific
Pipetten	0,1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µ	Eppendorf
Pipetus	240V	Hirschmann
Power Scanner		Tecan
VICTOR Multilabel Plate Reader	Victor-V-Reader	PerkinElmer
Vortexer	REAX1	Heidolph
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf

Software		
Statistische Auswertung	Prism	Graphpad
Statistische Auswertung	Word	Microsoft

Hersteller	
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Baxter	Baxter GbmH, Unterschleißheim, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
BioLegend	BioLegend, San Diego, CA, USA
Braun	B Braun AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GraphPad	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Hollborn & Söhne	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & CO KG, Leipzig, Deutschland
Milyenti Biotec	Milyenti Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Perkin Elmer	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Sarstedt	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tecan	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermo Fischer Scientific	Thermo Fischer Scientific Inc., Walldorf, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission

Die Blutentnahmen von den Patienten und die Verwendung von Materialien für diese Studie wurden nach ausführlicher Aufklärung der Patienten mit schriftlicher Einverständniserklärung durchgeführt. Die Studie wurde auf Grundlage der Deklaration von Helsinki (59h WMA General Assembly, Seoul, Korea; Oktober 2008) durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt (4).

2.2.2 Seren aus dem Blut von Patienten mit CSU und aus gesunden Probanden

Seren von 1062 Patienten mit CSU, von sieben Patienten mit idA und von 482 gesunde Kontrollprobanden wurden analysiert. Die Diagnosestellung (CSU und idA) und die Therapien erfolgten in der Klinik für Dermatologie und Allergologie, Charité-Universitätsmedizin leitliniengerecht. Folgende Leitlinien wurden hierzu verwendet: World Allergy Organization „Guidelines for the assessment and management of anaphylaxis“ bzw. European Academy of Allergy and Clinical Immunology/Global Allergy and Asthma European Network/European Dermatology Forum/World Allergy Organization urticaria guidelines (EAACI/GA²LEN/EDF/WAO Guideline). Die Seren wurden direkt nach der Blutentnahme und nach dem natürlichen Gerinnungsprozess vom Rest des Blutes getrennt und sofort bei -80° eingefroren und bis zur weiteren Nutzung gelagert (4).

2.2.3 “Urticaria Activity Score UAS7”

Die Bewertung des Schweregrades von CSU erfolgte durch die Einschätzung der Krankheitsaktivität über sieben Tage mit dem „Urticaria Activity Score UAS7“ (Max. erreichbare Punktzahl 42 bei schwerer Krankheitsaktivität) (Tabelle 3; Tabelle 4). Dazu werden Scores für Quaddel und Juckreiz erhoben (Tabelle 3). Für die Anzahl der Quaddel (0 Punkte für keine Quaddel bis 3 Punkte für starke Ausprägung der Quaddel) und für die Intensität des Juckreizes (0 Punkte für keinen Juckreiz bis 3 Punkte für starken Juckreiz) werden täglich zwei separate Punkte ermittelt und addiert (UAS; 0 Punkte für keine Beschwerden bis 6 Punkte für starke Beschwerden) (6).

Tabelle 3: „Urticaria Activity Score UAS“ zur Einschätzung der Krankheitsaktivität (6)		
Score	Quaddel	Juckreiz
0	Keine	Keine
1	Leicht (weniger als 20 Quaddel/24 Stunden)	Leicht (vorhanden, aber nicht störend)
2	Moderat (20 – 50 Quaddel/24 Stunden)	Moderat (störend, aber beeinflusst nicht die tägliche Aktivität oder den Schlaf)
3	Stark (mehr als 50 Quaddel/24 Stunden oder große konfluierende Stellen von Quaddeln)	Stark (stärker Juckreiz, stört die normale tägliche Aktivität oder den Schlaf)

Die Dokumentation der Krankheitsaktivität erfolgt über sieben Tage (Tabelle 4). Am Ende einer Woche werden die Punkte erneut zu einem Score addiert (UAS7; 0 Punkte = frei von Urtikaria; 1 – 6 Punkte = gut kontrollierte Urtikaria; 7 – 15 Punkte = milde Urtikaria; 16 – 27 Punkte = moderate Urtikaria; 28 – 42 Punkte = schwere Urtikaria).

Tabelle 4: „Urticaria Activity Score UAS7“ über 7 Tage (6)					
Datum	Anzahl der Quaddeln täglich		Juckreiz Intensität täglich		UAS Score täglich
Beispiel	①  ② ③	+	① ②  ③	=	① ②  ④ ⑤ ⑥
Tag 1	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
Tag 2	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
Tag 3	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
Tag 4	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
Tag 5	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
Tag 6	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
Tag 7	① ② ③	+	① ② ③	=	① ② ③ ④ ⑤ ⑥
„Urticaria Activity Score UAS7“ über 7 Tage – Gesamtergebnis: 0 Punkte– max. 42 Punkte					

2.2.4 Detektion von potenziellen Autoantigenen mittels Protein-Microarray

Es wurde von sieben CSU-Patienten, sieben idA-Patienten und sieben gesunden Probanden jeweils 1 Milliliter Serum auf einem PMA (Version 5.1; ThermoFisher, Waltham, Mass) mit 9374 menschlichen Proteinen bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Das PMA wurde nach der Inkubation dreimal mit einer Lösung aus PBS und 0,05% Tween-20 (TPBS; Sigma, München, Deutschland) gewaschen und erneut mit 1 ml Farbstoff-Lösung (jeweils 1 µg/ml anti-human IgG-Phycoerythrin aus der Maus (Klon G18-145) und anti-human IgE-Allophycocyanin aus der Maus (Klon MHE-18), beide von BioLegend, San Diego, CA, USA) in 2% humanem Albumin (in klinischer Reinheit; von Baxter, Unterschleißheim, Deutschland, in TPBS) für weitere 30 Minuten in einem verdunkelten Raum inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschvorgang mit TPBS und anschließend drei Waschvorgänge mit Wasser. Die Messung wurde mit dem „Power Scanner“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) in einer 2 µm Auflösung vorgenommen. Um unspezifische Bindungen zu entfernen und die Spezifität der monoklonalen Ak zu testen, wurden auch PMA verwendet, die vorher nicht mit Serum inkubiert wurden. Signale, die aus Immunoglobulin-Proteinbindungen, wie z.B. durch die Bindung an die TRIM-Domänen und FcR-Rezeptoren, entstanden, wurden nachträglich entfernt. Die gemessenen Werte für die Signalstärke wurden als Mittelwerte oder als Z-Score berechnet.

2.2.5 Messungen von IgE-anti-IL24 mittels Sandwich-ELISA

Die Messungen mittels Sandwich-ELISA (Abbildung 4) wurden an 1062 CSU-Patienten und 482 gesunden Kontrollen durchgeführt. Für die ELISA-Messungen wurden die „black NUNC Maxi-Sorb“ 384-Well-Platten (Thermo Fischer) benutzt. Die Platten wurden zuerst mit 25 µl/Well anti-IgE-Lösung beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Anti-IgE-Lösung beinhaltete 16 µg anti-IgE (MHE-18; BioLegend) in 10 ml Beschichtungs-Puffer mit 0,1 mol/l Karbonat (pH9; Sigma). Nach der Beschichtung mit Anti-IgE wurden die Platten mit 2% Humanalbumin in TPBS über Nacht bei 4°C geblockt. Am nächsten Tag wurden Patienten-Seren aus einer 96-Well-Platte als vier je 25 µl/Well-Replikate in die 384-Well-Platte überführt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschvorgang mit dreimal TPBS und dreimal Wasser und anschließend wurde die Platte mit 25 µl/Well Ag-Lösung beladen und bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Die Ag-Lösung bestand aus IL-24 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,

Deutschland), das mit 4 µg Bindungsproteinen 4,4''-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafluoro-1,3-dioxohexyl)-o-terphenyl-4'-sulfonyl chloride (BHHCT, Molarverhältnis von 1:30; Sigma) konjugiert sowie mit dem Lanthanoid Europium (Sigma) gesättigt wurde in 50 µmol/l Stabilisator Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)-Gereinigtem Rinderserumalbumin (BSA Bovines Serumalbumin) (PerkinElmer, Waltham, Mass) und 50 mmol/l Tris Puffer (pH8) je 10 ml. Nach der einstündigen Inkubation wurde die Platte zehnmal mit Wasser gewaschen und mit 25 µl/Well DELFIA Verstärker-Lösung („enhancer solution“, PerkinElmer) beladen. Die Platten wurden mit dem Victor-V-Reader (PerkinElmer) in der StandardEinstellung gemessen.

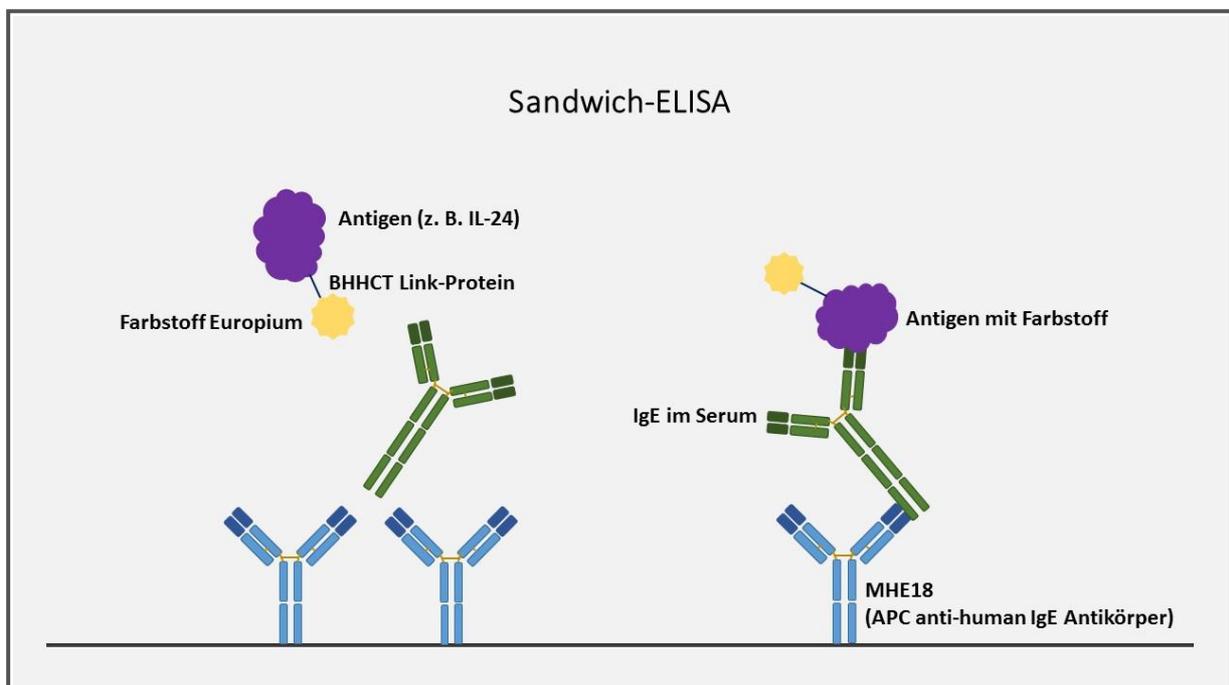


Abbildung 4: Sandwich-ELISA Funktionsweise (modifiziert)

Die 384-Well-Platten wurden mit MHE18 beladen (IgG-Ak, die gegen humane IgE-Ak gerichtet sind, hier blau dargestellt). Die IgE-Ak (hier grün) aus dem Patientenserum binden an die Antigenstelle des MHE18. Ag (hier IL-24) wurden zuvor über ein Linkprotein (BHHCT) mit dem Lanthanoid Europium (fluoreszierender Farbstoff) markiert. Die markierten Ag binden an die Antigenstelle der Patienten-IgE, die zuvor mit dem MHE18 abgefangen wurden; Abkürzungen: Ag: Antigen; Ak: Antikörper, IgE: Immunoglobulin E, IgG: Immunoglobulin G.

2.2.6 Bestimmungen der IgE-anti-IL-24 Einheiten

Um die mit dem ELISA und mit dem Microarray gemessenen IgE-anti-IL-24-Werte in internationale Einheiten per Milliliter anzugeben, wurde eine Standardkurve angewendet. Die Standardkurve wurde mittels Messungen mit rekombinantem IgE-anti-grün fluoreszierendem Protein (GFP, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) ermittelt. Die Gesamtmenge des mittels Microarray gemessenen autoreaktiven IgE sowie der prozentuale IgE-anti-IL-24 Anteil davon wurde mithilfe der IgE-anti-IL-24 Proteinspots ermittelt. Um den prozentualen Wert des mittels ELISA gemessenen IgE-anti-IL-24 zu bestimmen, wurde das Gesamt-IgE herangezogen. Das Gesamt-IgE wurde durch das Zentrallabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin gemessen. Der Grenzwert für erhöhte IgE-anti-IL-24-Werte wurde anhand einer ROC-Kurve dargestellt und mithilfe des Youden-Index berechnet (Abbildung 7).

2.2.7 Bestimmung der basophilen Zellen

Die Bestimmung der basophilen Zellen im Blut erfolgte direkt nach der Blutentnahme mithilfe eines automatischen Hämozytometers über das Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

2.2.8 Bestimmung des Anti-HBs-AK-Titers

Die Bestimmung des Anti-HBs-AK-Titers erfolgte direkt nach der Blutentnahme aus dem Serum-Blut mithilfe eines ELISAs über das Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

2.2.9 Bestimmung des Triiodthyronin (T3)

Die Bestimmung T3 erfolgte direkt nach der Blutentnahme aus dem Serum-Blut mithilfe eines Elektro Chemilumineszenz Immuno-Assays über das Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

2.2.10 Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)

Die Selbstbeurteilung von Angst- und Depressions-Symptomen durch den Patienten erfolgte mithilfe eines Fragebogens mit 14 Fragen - je 7 Fragen zu Angst- und zu Depressions-Symptomen (Tabelle 5) (46). Dabei sollten die Patienten die Symptome der vergangenen Woche beurteilen. Für jede Frage können nach Schweregrad Punkte zwischen 0-3 vergeben werden, wobei die 0 für keine Symptome und die 3 für starke Symptome steht. Die Punkte werden anschließend separat für Angst und für Depression addiert und einzeln bewertet. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt wie folgt: 0-7 Punkte unauffälliger Befund, 8-10 suspekt, >10 auffälliger Befund.

Tabelle 5: "Hospital Anxiety and Depression Scale" (HADS) (46)			
A	Ich fühle mich angespannt/überreizt	D	Ich fühle mich in Aktivitäten gebremst
3	Die meiste Zeit	3	Fast die gesamte Zeit
2	Sehr oft	2	Sehr oft
1	Gelegentlich	1	Manchmal
0	Überhaupt nicht	0	Überhaupt nicht
D	Ich kann mich heute noch wie früher freuen	A	Ich habe manchmal ein ängstliches Gefühl in Bauch
0	Definitiv zu viel	0	Überhaupt nicht
1	Nicht ganz so oft	1	Gelegentlich
2	Nur ein wenig	2	Ziemlich oft
3	Kaum noch	3	Sehr oft
A	Ich habe eine ängstliche Vorahnung, dass was Schreckliches passieren könnte	D	Ich habe das Interesse an äußeren Erscheinung verloren
3	Sehr eindeutig und ganz stark	3	Definitiv
2	Ja, aber nicht allzu stark	2	Ich beachte es nicht mehr wie ich es sollte
1	Ein wenig, aber es besorgt mich nicht	1	Ich beachte es nicht mehr ganz so sehr
0	Überhaupt nicht	0	Ich kümmere mich so wie immer
D	Ich kann lachen und lustige Seiten der Dinge sehen	A	Ich fühle mich rastlos, muss immer in Bewegung sein
0	Immer so oft ich kann	3	Tatsächlich sehr oft
1	Nicht ganz so oft zurzeit	2	Ziemlich oft
2	Definitiv nicht sehr oft zurzeit	1	Nicht sehr oft
3	Überhaupt nicht	0	Überhaupt nicht
A	Ich habe beunruhigende Gedanken in meinem Kopf	D	Ich blicke mit Freude auf zukünftige Dinge
3	Die meiste Zeit	0	So sehr wie ich es jemals getan habe
2	Sehr oft	1	Eher weniger als ich es sonst gewohnt bin
1	Von Zeit zu Zeit, aber nicht zu oft	2	Definitiv weniger als ich es sonst gewohnt bin
0	Nur gelegentlich	3	Kaum noch

D	Ich fühle mich glücklich	A	Ich bekomme einen plötzlichen, panikartigen Zustand
3	Überhaupt nicht	3	Tatsächlich sehr oft
2	Nicht oft	2	Ziemlich oft
1	Manchmal	1	Nicht sehr oft
0	Die meiste Zeit	0	Überhaupt nicht
A	Ich kann behaglich dasitzen und fühle mich entspannt	D	Ich kann mich an gutem Buch oder Radio oder Fernsehsendung erfreuen
0	Definitiv	0	Oft
1	Gewöhnlich	1	Manchmal
2	Nicht oft	2	Nicht oft
3	Überhaupt nicht	3	Sehr selten

Aus dem englischen Original ins Deutsche übersetzter HADS-Fragebogen. A: Items zur Ängstlichkeit; D: Items zur Depression. Jedes Item wird mit Punkten zwischen 0 – 3 bewertet. Die Werte für Ängstlichkeit (A) und für Depression (D) werden separat addiert und einzeln bewertet. Beurteilung der Punktwerte jeweils für Ängstlichkeit und Depression: 0 – 7 = unauffällig; 8 – 10 = suspekt, grenzwertig; 11 – 21: auffällig; Abbildung modifiziert nach (46).

2.2.11 Statistische Auswertungen

Die Normalverteilung wurde mithilfe des „D’Agostino-Pearson Omnibus Tests“ getestet. Zur Durchführung des t-Tests und der Varianzanalyse diente die Gauß-Verteilung. Die Holm-Sidak-Methode wurde zur Korrektur von multiplen Tests angewendet. Bei sehr kleinen P-Werten ($p < 0,05$) wurde angenommen, dass es sich bei den Werten nicht um zufällige Werte handelt (mittels Nullhypothese). Bei der Darstellung der Ergebnisse haben wir den Mittelwert mit der Standardabweichung bzw. den Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Das IgE von Patienten mit CSU bindet viele Autoantigene

Zur Detektion von CSU-spezifischen Aag wurden die Seren von sieben Patienten mit CSU, sieben Patienten mit idiopathischer Anaphylaxie (idA) und sieben gesunden Probanden mittels Proteinarray durchsucht (Abbildung 5). Von den 9374 menschlichen Proteinen wurden 226 Proteine durch die IgE-Ak von CSU-Patienten gebunden. Jedoch nur das lösliche, extrazelluläre und von der Haut gebildete IL-24 wurde als Autoallergen vom IgE aller CSU-Patienten erkannt. Insgesamt wurden 226 (222 + 4) Proteine durch das IgE von CSU-Patienten, 161 (157 + 4) Proteine durch das IgE von Patienten mit idA und 34 Proteine durch das IgE von gesunden Probanden detektiert, wobei es bei 4 Proteinen Überschneidungen gab. Diese 4 Proteine wurden sowohl durch das IgE von Patienten mit CSU als auch durch das IgE von Patienten mit idA erkannt (Abbildung 6). Das IgE von Patienten mit CSU erkannte insgesamt 222 Aag, im Vergleich dazu erkannte das IgE von Patienten mit idA 157 Aag und das IgE der gesunden Probanden nur 34 Aag.

3.2 IL-24 ist ein CSU-spezifisches IgE-Autoantigene in der Haut

Die 222 Aag wurden nicht vom IgE aller CSU-Patienten gleichermaßen erkannt. Wir wählten aus den detektierten Aag diese aus, die mindestens von der Hälfte der CSU Patienten erkannt wurden. Von den 222 Aag wurden wiederum 31 Aag von über 70 % der CSU-Patienten erkannt. 8 der 31 Aag waren zugänglich und wurden in der Haut gebildet. Von den 8 Aag waren 4 löslich, die anderen 4 Aag waren membrangebunden. Unter den 8 Aag war nur das IL-24 als zugängliches, extrazelluläres und spezifisches IgE-Aag, das auch von allen CSU-Patienten erkannt worden war (Abbildung 5). Die restlichen 23 Aag von den 31 Aag waren intrazellulär lokalisiert.

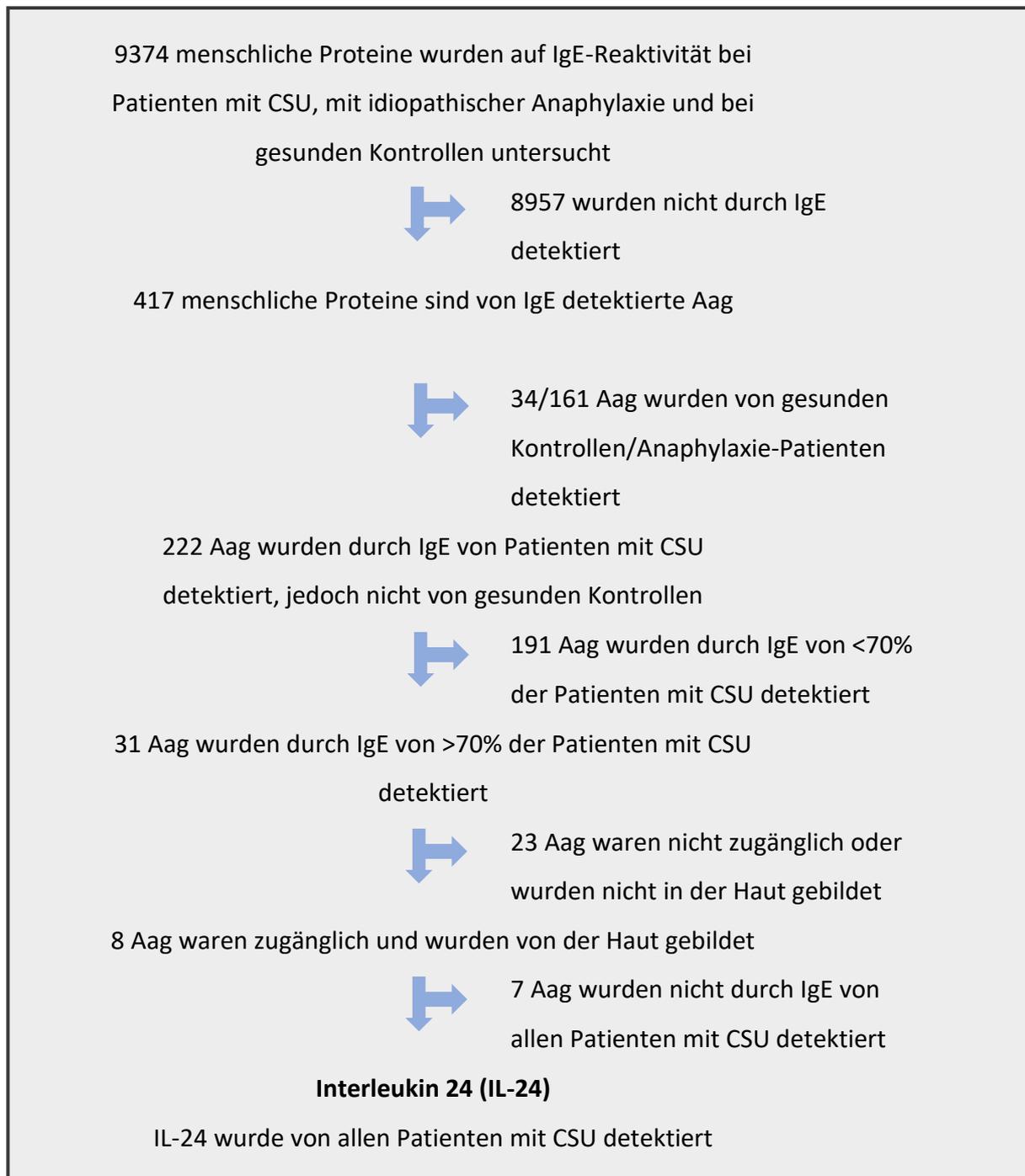


Abbildung 5: Selektionsprozess von Interleukin-24 (IL-24) als spezifisches, in der Haut gebildetes und von IgE detektiertes Aag bei CSU-Patienten

Von 222 Aag bei CSU-Patienten sind acht zugänglich für Ak. IgE-anti-IL-24 wurde in allen CSU-Patienten detektiert, jedoch nicht bei Patienten mit IdA und nicht bei gesunden Kontrollen. Abkürzungen: Aag: Autoantigen, Ak: Antikörper CSU: chronisch spontane Urtikaria, IdA: idiopathische Anaphylaxie, IgE: Immunoglobulin E; Abbildung modifiziert nach (4).

3.3 IgE-anti-IL-24 ist das am häufigsten vorkommende IgE-Autoantigene in Patienten mit CSU

Die PMA-Analysen haben gezeigt, dass bei allen CSU-Patienten das IgE-anti-IL-24 mit einem Wert von 1,1% (Mittelwert \pm Standardabweichung, 0,6% \pm 0,24%) den höchsten Serumwert von allen gemessen IgE-Aak aufweist. Es bestand keine Korrelation ($p = 0,840$) zwischen dem Gesamtwert von IgE-anti-IL-24 im Serum und Gesamt-IgE.

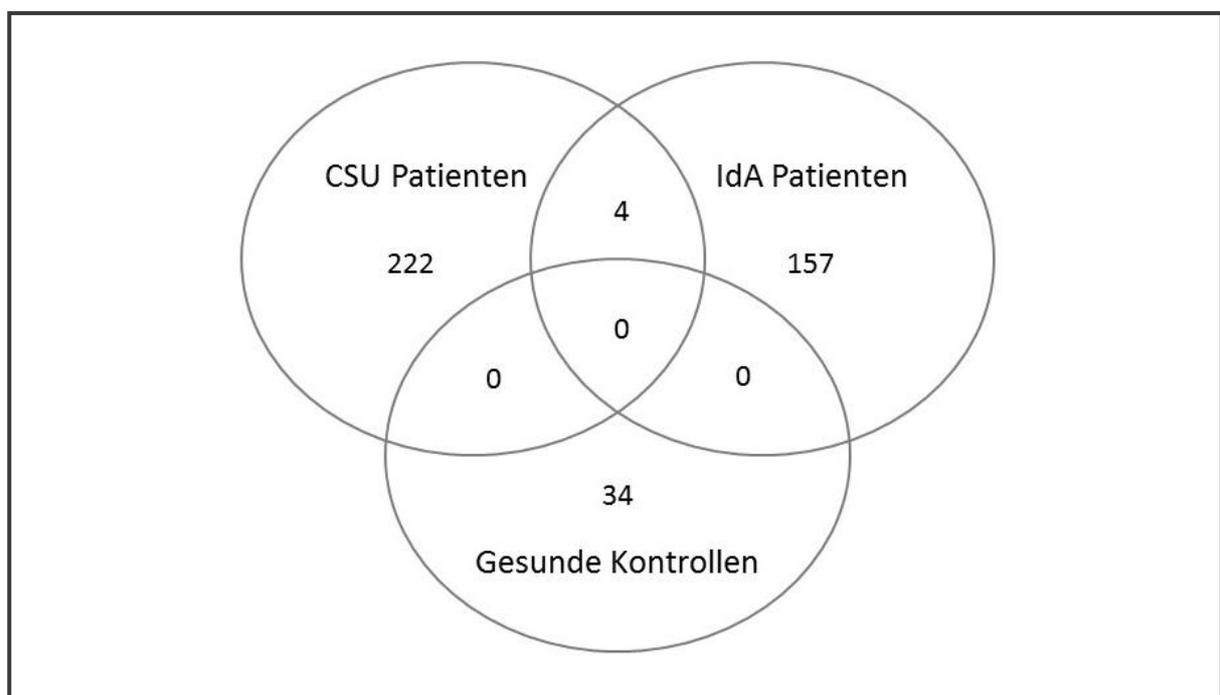


Abbildung 6: Anzahl der gefundenen Autoantigene bei Patienten mit CSU, IdA und bei gesunden Kontrollen

Abkürzungen: CSU: chronisch spontane Urtikaria; IdA: idiopathische Anaphylaxie; Abbildung modifiziert nach (4).

3.4 Das Autoantigen IgE-anti-IL-24 ist ein sensitiver und spezifischer Marker für CSU

Mithilfe eines selbst entwickelten Sandwich-ELISAS konnten wir die erhöhten IgE-anti-IL-24-Werte bei CSU-Patienten messen. Wir verwendeten dafür die Blutseren von CSU-Patienten (N=1062) und von gesunden Probanden (N=482) zum Vergleich. Der Mittelwert \pm Standardabweichung für IgE-anti-IL-24 Serumwerte lagen bei $0,52 \pm 0,24$ IU/ml und $0,27 \pm 0,08$ IU/ml ($p = 0,001$) (Abbildung 7A). Von insgesamt 1062 Patientenseren mit CSU wurden in 874 (80%) erhöhte Werte für IgE-anti-IL-24 gemessen; im Vergleich wurden bei 482 Seren von gesunden Probanden 99 (20%) mit höheren IgE-anti-IL-24 Werten gemessen ($p < 0,0001$). Der Grenzwert wurde auf 0,33 IU/ml festgelegt (Abbildung 7B). Die Messungen haben gezeigt, dass IgE-anti-IL-24 mit einer Sensitivität von 80% (95% CI, 76% bis 83%), Spezifität von 80% (95% CI, 75% bis 84%) und dem Likelihood-Quotienten von 3,89 CSU vorhersagen kann (Abbildung 7C).

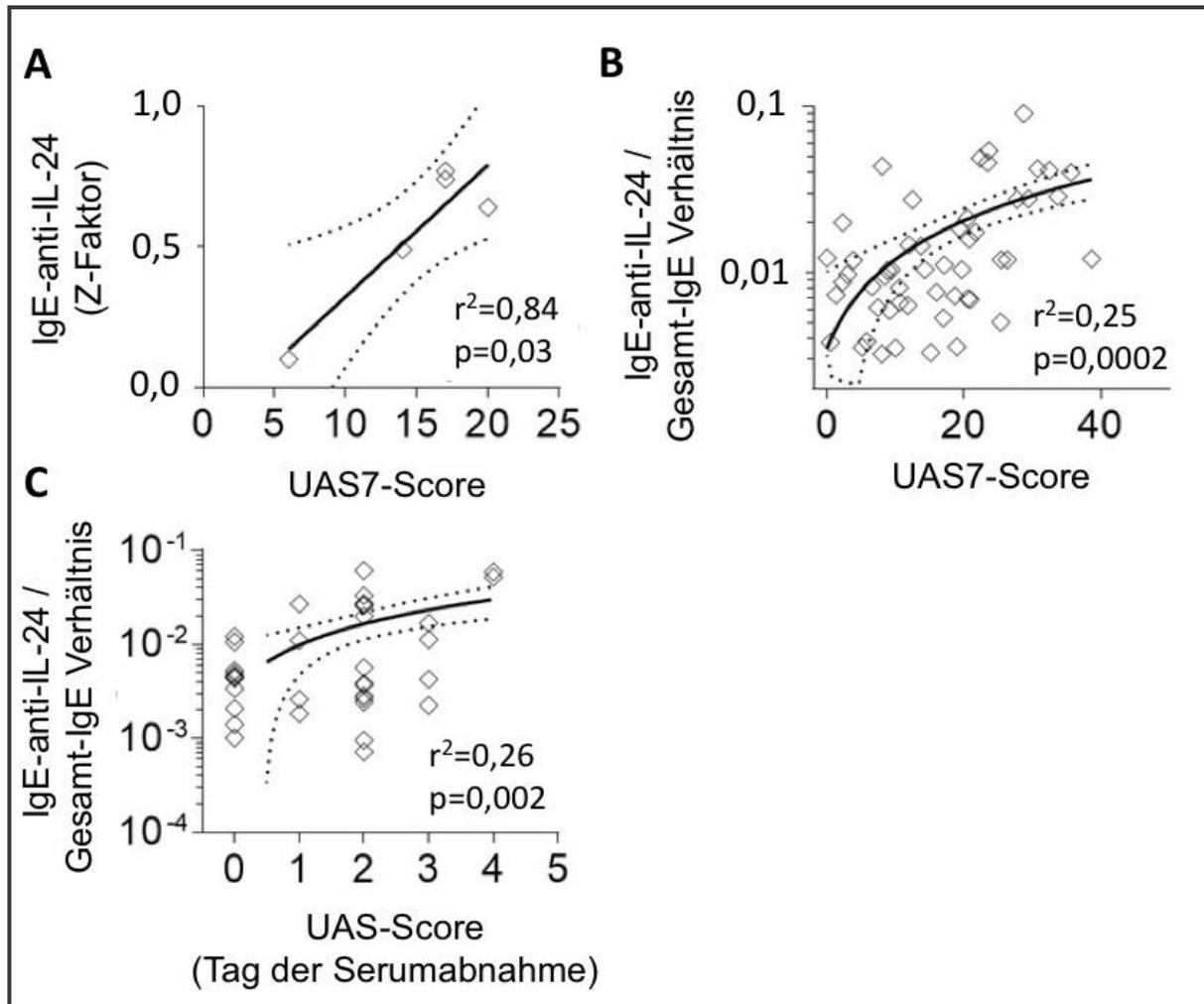


Abbildung 8: Korrelation von IgE-anti-IL-24 mit CSU Krankheitsaktivität

Hohe IgE-anti-IL-24-Werte sind assoziiert mit hoher Krankheitsaktivität. A) Hohe IgE-anti-IL-24-Werte sind assoziiert mit der Krankheitsaktivität, gemessen mittels UAS7. Die Krankheitsaktivität wurde bei fünf von sieben Patienten erhoben, die mittels PMA getestet wurden (für zwei der CSU-Patienten waren keine UAS7 vorhanden). B) Hohe IgE-anti-IL-24-Werte relativ zum Gesamt-IgE, gemessen mittels ELISA, waren assoziiert mit hoher Krankheitsaktivität, erhoben mittels UAS7, welches die Aktivität der letzten sieben Tage vor der Blutentnahme abbildet (N=52, gemittelt aus N=580 zur besseren Darstellung, d. h. jeder Datenpunkt zeigt einen Durchschnittswert von 15 originalen Datenpunkten). C) Hohe relative IgE-anti-IL-24-Werte zum Gesamt-IgE (mit ELISA gemessen) waren assoziiert mit hoher CSU-Krankheitsaktivität, erhoben am Tag der Blutentnahme durch UAS. Lineare Regression, die Regressionslinien werden gezeigt mit 95% Konfidenzintervall als gepunktete Linien; Abkürzungen: CSU: chronisch spontane Urtikaria, ELISA: „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“, IgE: Immunglobulin E, PMA: Protein-Microarray, UAS7: Urtikaria Aktivitäts-Score; Abbildung modifiziert nach (4).

3.5 Hohe IgE-anti-IL-24 Serumwerte korrelieren mit der CSU Krankheitsaktivität

Die mittels PMA gemessenen IgE-anti-IL-24 Serumwerte korrelieren mit der CSU Krankheitsaktivität ($p=0,03$; Abbildung 8A). Auch die mittels ELISA gemessenen IgE-anti-IL-24 Werte zeigen eine Korrelation zur erhöhten Krankheitsaktivität, ermittelt mit dem UAS7 über sieben Tage ($p=0,0002$; Abbildung 8B; Abbildung 10) und mit dem UAS ($p=0,02$; Abbildung 8C). Die durchschnittliche Krankheitsdauer lag für die Patienten mit CSU bei 5 Jahren. Der durchschnittliche Aktivitäts-Score lag bei 16,7 Punkten. 50% unserer Patienten mit CSU zeigten zusätzlich Angioödeme.

3.6 Hohe relative IgE-anti-IL-24 Serumwerte sind mit niedrigeren basophilen Zellen assoziiert

Wie in der Abbildung 9 dargestellt, sind hohe IgE-anti-IL-24 Serumwerte mit niedrigeren basophilen Zellen im Blut der Patienten mit CSU assoziiert. Patienten mit nicht messbaren basophilen Zellen hatten höhere relative IgE-anti-IL-24 Serumwerte ($p=0,001$).

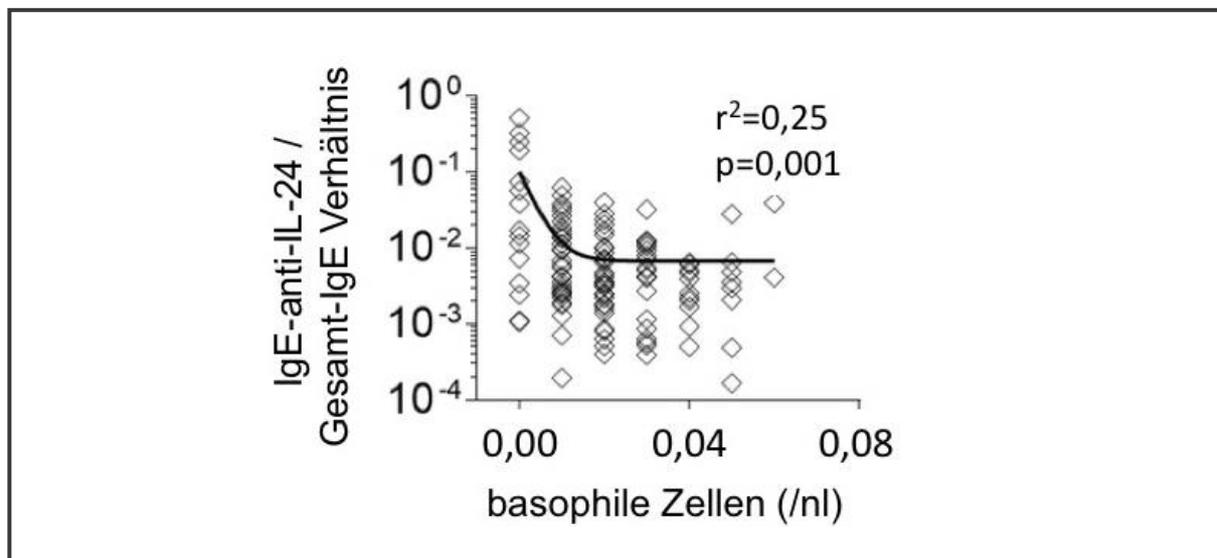


Abbildung 9: Hohe relative IgE-anti-IL-24 Serumwerte korrelieren mit niedrigeren basophilen Zellen

Hohe relative IgE-anti-IL-24 Serumwerte zum Gesamt-IgE korrelieren mit niedriger Basophilenanzahl im Blut (sigmoidale Regressionslinie; $p=0,001$; $N=141$); gemessen mittels ELISA; Abkürzungen: „Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgE: Immunoglobulin E, IL: Interleukin, Abbildung modifiziert nach (4).

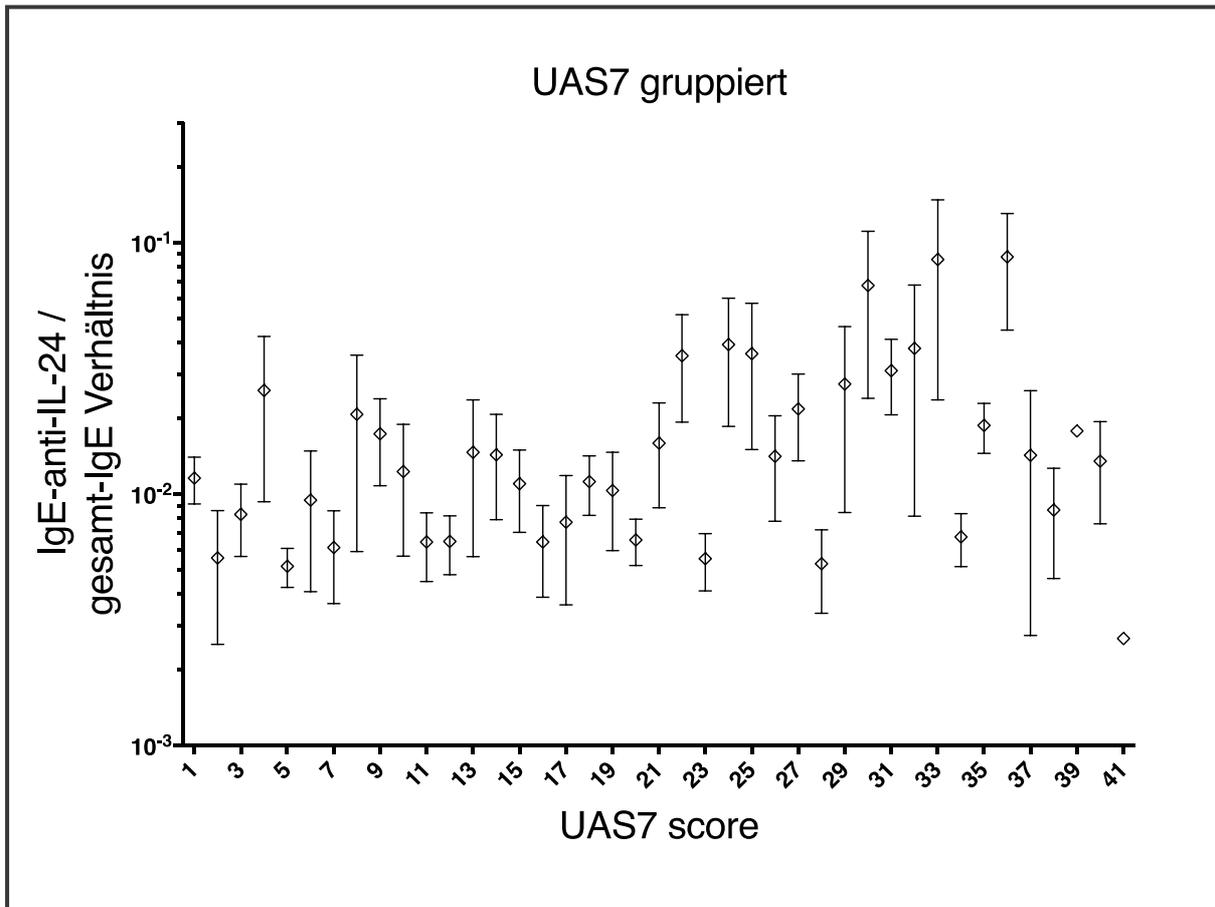


Abbildung 10: Korrelation IgE-anti-IL-24/Gesamt-IgE-Verhältnis mit UAS gruppiert

Hohe IgE-anti-IL-24-Werte relativ zum Gesamt-IgE sind mit hoher Krankheitsaktivität assoziiert, gemessen mit UAS7. Patienten mit demselben UAS7 Ergebnis wurden zusammengefasst. Es werden die Mittelwerte der IgE-anti-IL-24-Werte zu Gesamt-IgE mit Standardabweichung angezeigt, getestet mittels ELISA, Abkürzungen: ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgE: Immunglobulin E, IL: Interleukin, UAS7: „Urticaria activity score“ über 7 Tage.

3.7 CSU-Patienten mit Hepatitis-B Schutzimpfung haben niedrigere IgE-anti-IL-24 Werte

CSU-Patienten mit einer ausreichenden Schutzimpfung gegen Hepatitis B nach frischer Impfung (13 Patienten mit HBs-Ak > 1000 IU/l) zeigen niedrigere IgE-anti-IL24 Werte. Bei ca. 73 % der Patienten konnten keine HBs-Ak nachgewiesen werden oder lagen bei < 10 IU/l. Der Cut-off für höhere IgE-anti-IL-24 Werte liegt bei 0,33 IU/ml (gepunktete Linie), mit einer Spezifität von 80% und einer Sensitivität von 80% ($p=0,0003$) (Abbildung 11).

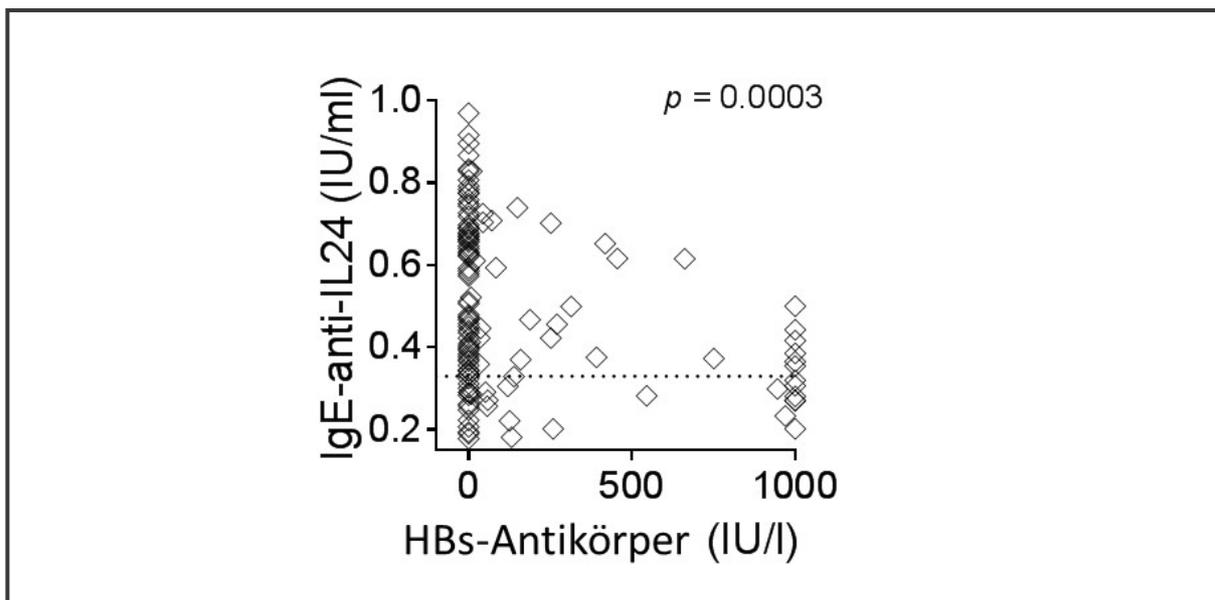
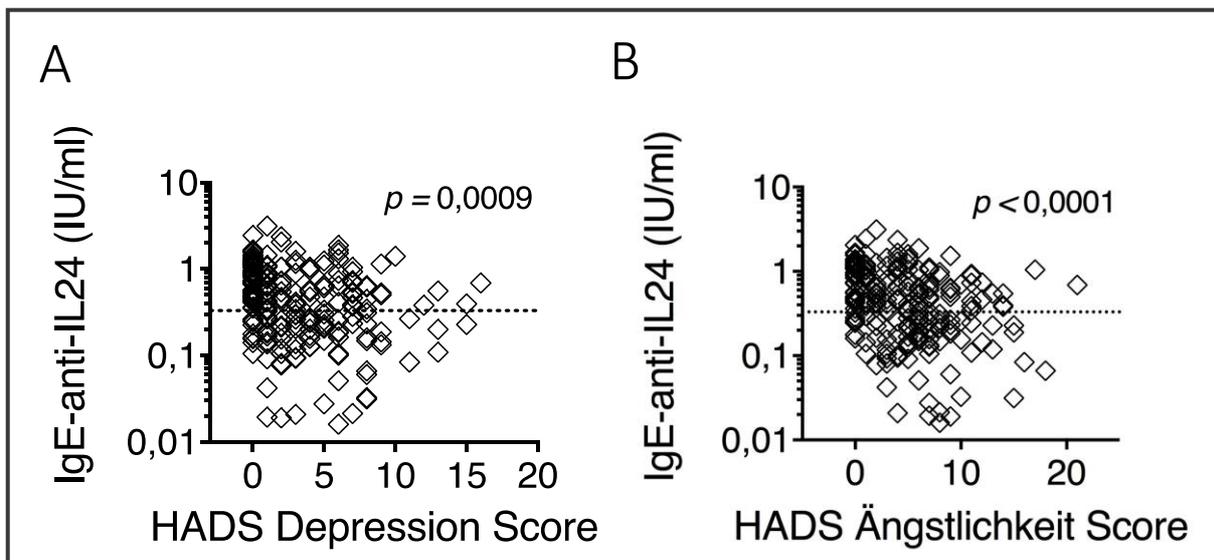


Abbildung 11: Korrelation zwischen IgE-anti-IL-24 und Anti-HBs-Antikörpern

Es wurden Seren von CSU-Patienten untersucht (N=147). Patienten mit einem hohen Antikörperstatus gegen Hepatitis B (Anti-HBs-Ak > 100 IU/l) zeigen im Durchschnitt niedrigere IgE-anti-IL24-Werte. Bei ca. 73% der CSU-Patienten konnten am Tag der Blutentnahme keine HBs-Ak nachgewiesen werden. Der Schwellenwert für höhere IgE-anti-IL-24 Werte liegt bei 0,33 IU/ml (gepunktete Linie), mit einer Spezifität von 80% und einer Sensitivität von 80%. $p=0,0003$; Abkürzungen: Ak: Antikörper, CSU: chronisch spontane Urtikaria, IgE: Immunoglobulin E, IL: Interleukin.

3.8 Hohe IgE-anti-IL-24 Werte korrelieren mit niedrigeren HADS-Scores

CSU-Patienten mit höheren IgE-anti-IL-24 Serumwerten gaben an, weniger ängstlich und weniger depressiv zu sein. Hohe IgE-anti-IL-24 Serumwerte korrelieren mit niedrigeren „HADS Depression-Scores“ (N=213) und mit niedrigeren „HADS Ängstlichkeit-Scores“ (N=207; Abbildung 12).

**Abbildung 12: Korrelation zwischen IgE-anti-IL-24 und Depression/Ängstlichkeit**

CSU-Patienten mit hohen IgE-anti-IL-24-Serumwerten gaben an, weniger depressiv und weniger ängstlich zu sein. Hohe IgE-anti-IL-24-Serumwerte korrelieren mit niedrigeren „HADS Depression-Scores“ (N=213) und mit niedrigeren „HADS Ängstlichkeit-Scores“ (N=207). Der Schwellenwert für höhere IgE-anti-IL-24 Werte liegt bei 0,33 IU/ml (gepunktete Linie), mit einer Spezifität von 80% und einer Sensitivität von 80% (Abbildung A: $p=0,0009$; Abbildung B: $p<0,0001$), Abkürzungen: CSU: chronisch spontane Urtikaria, HADS: „Hospital anxiety and depression scale“, IgE: Immunglobulin E, IL: Interleukin.

3.9 Hohe Triiodthyronin Serumwerte sind mit niedrigen IgE-anti-IL-24 assoziiert

Höhere Triiodthyronin (T3) (Referenzbereich: 0,8 – 2,0 $\mu\text{g/l}$) waren mit niedrigeren IgE-anti-IL-24 Serumwerten (gemessen mittels ELISA, Cut-off bei 0,33 IU/ml) assoziiert (leichte Korrelation; $r=0,3143$; $p=0,0004$; $N=122$). Von 122 Patienten hatten 74 T3 Serumwerte im Referenzbereich. Der Mittelwert für den IgE-anti-IL-24 Serumwert lag bei 0,51 IU/ml (Cut-off bei 0,33 IU/ml). 45 Patienten hatten erhöhte T3 Serumwerte ($> 2,0 \mu\text{g/l}$). Hier lag der Mittelwert für IgE-anti-IL-24 bei 0,39 IU/ml und war somit niedriger. 3 Patienten hatten T3 Serumwerte $<0,8 \mu\text{g/l}$ mit einem IgE-anti-IL-24 Mittelwert von 0,49 IU/ml (Abbildung 13).

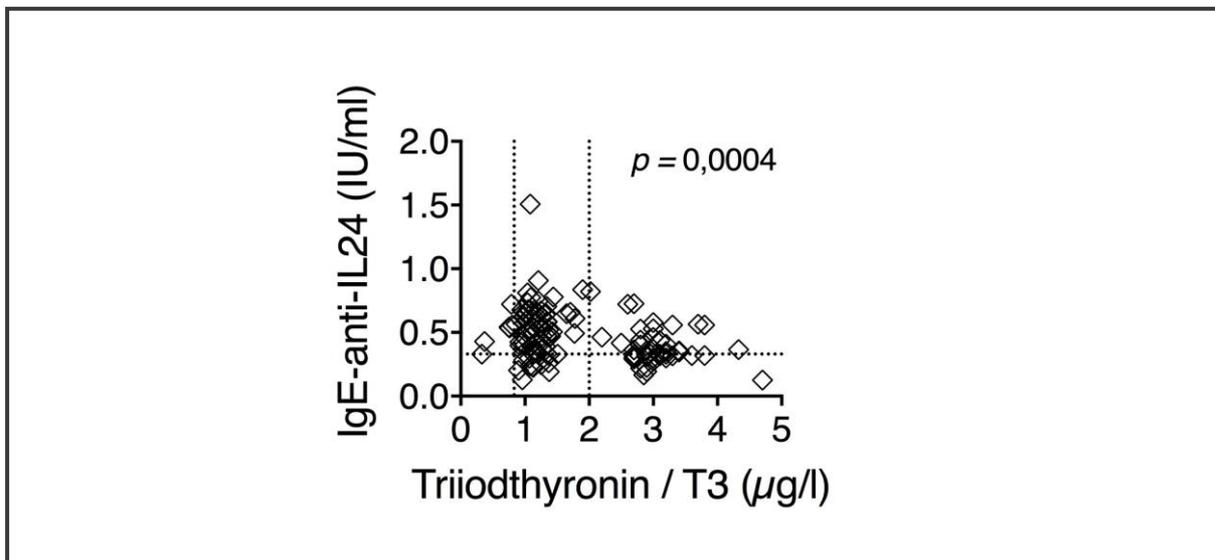


Abbildung 13: Höhere T3 Serumwerten sind mit niedrigerem IgE-anti-IL-24 assoziiert

Höhere T3 Serumwerte sind mit niedrigeren IgE-anti-IL-24 Serumwerten (gemessen mittels ELISA; Schwellenwert bei 0,33 IU/ml) assoziiert (leichte Korrelation; $r=0,3143$; $p=0,0004$; $N=122$). Der Referenzbereich für T3 liegt bei 0,8 – 2,0 $\mu\text{g/l}$ (senkrechte gepunktete Linien). Der Schwellenwert für höhere IgE-anti-IL-24 Werte liegt bei 0,33 IU/ml (waagerechte gepunktete Linie), mit einer Spezifität von 80% und einer Sensitivität von 80%. Abkürzungen: ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgE: Immunglobulin E, IL: Interleukin T3: Triiodthyronin.

3.10 Keine signifikanten Unterschiede in der Alters- und Geschlechterverteilung

Die Alters- und Geschlechterverteilung bei CSU-Patienten (N=1062, Alter Mittelwert \pm Standardabweichung $44,0 \pm 14,7$; Frauenanteil 73%), bei idA-Patienten (N=7; Alter Mittelwert \pm Standardabweichung $44,4 \pm 13$, Frauenanteil 57%) und bei gesunden Kontrollen (N=482; Alter Mittelwert \pm Standardabweichung $46,9 \pm 16,7$; Frauenanteil 61%) zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 6, Abbildung 13).

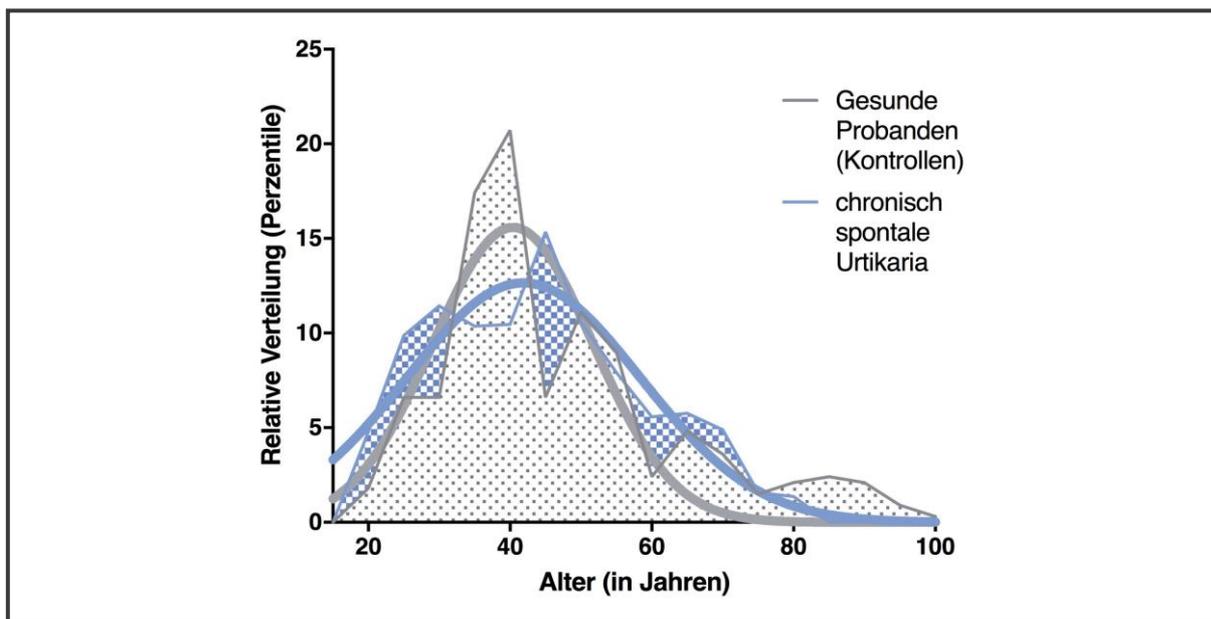


Abbildung 14: Altersverteilung CSU-Patienten und gesunde Kontrolle

Für die Tests mittels ELISA untersuchte Gruppen zeigten ähnliche Altersverteilung. Beide Populationen zeigen keine signifikanten Altersunterschiede (CSU: Mittelwert \pm SD = $44,0 \pm 14,7$ Jahre; Gesunde Kontrollen: Mittelwert \pm SD = $46,9 \pm 16,7$ Jahre). Abkürzungen: ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, CSU: chronisch spontane Urtikaria.

Tabelle 6: Alters- und Geschlechterverteilung

	CSU Patienten	Gesunde Kontrollen	idA Patienten
N=	1062	482	7
Alter Mittelwert \pm SD	$44,0 \pm 14,7$	$46,9 \pm 16,7$	$44,4 \pm 13$
Frauenanteil in %	73	61	57

Gleiche Alters- und Geschlechterverteilung bei allen drei Gruppen. Abkürzungen: CSU: chronisch spontane Urtikaria, idA: idiopathische Anaphylaxie.

4. Diskussion

4.1 Übersicht der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit CSU reaktive IgE-Ak gegen multiple Aag besitzen. Die detektierten Aag bei CSU-Patienten unterscheiden sich von Patienten mit IdA und von gesunden Kontrollen. Unter den detektierten Aag war IL-24 das am häufigsten vorkommende, spezifische Aag bei Patienten mit CSU. IL-24 wird in der Haut exprimiert und stellt eine mögliche Ursache für eine IgE-vermittelte Reaktion von Mastzellen dar und führt infolgedessen zur Entstehung der CSU.

4.2 Die Detektion von Autoantigenen

In dieser Arbeit wurde zum Screening von CSU-Patienten ein Proteinarray mit 9374 menschlichen Proteinen benutzt. Bislang ist dies die erste großangelegte Screening-Analyse zur Detektion von Aag bei CSU-Patienten in der Literatur. Frühere Studien hatten nur einzelne IgE Reaktivitäten gegenüber Aag gemessen (wie z.B. gegen Thyreoperoxidase oder DNA), in diesen Analysen wurden jedoch keine „Screening-Assays“ verwendet (18, 19, 45). Mit dem Proteinarray konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität von IgE von CSU-Patienten mit 226 Aag deutlich höher ist als die Reaktivität von IgE bei gesunden Kontrollen, bei denen nur 34 Aag zu finden waren.

Eine weitere wichtige Beobachtung in dieser Arbeit war, dass CSU-Patienten auch eine deutlich höhere Anzahl an detektierten Aag im Vergleich zu Patienten mit IdA aufzeigten. Das IgE von Patienten mit IdA detektierte 161 Aag im Vergleich zu 226 Aag bei Patienten mit CSU. Ausgehend von den Ergebnissen kann angenommen werden, dass die hohe IgE-Reaktivität auf die verschiedenen Aag bei beiden Populationen (CSU und IdA) spezifisch ist und nicht als Artefakte gewertet werden können, da das IgE von gesunden Kontrollen Reaktivität auf 34 Aag zeigte.

Gegenwertig konnten wir in der Studie nicht klären, ob die Reaktivität auf die unterschiedlichen Aag von einem spezifischen IgE oder von verschiedenen IgE-Aak ausgeht. Wir gingen bei unseren Messungen und Auswertungen von einem spezifischen IgE aus. Sollte das IgE nicht monovalent sein und sollte während der Microarray-Messungen deshalb nur ein kleinerer Teil der IgE-Aak an IL-24 gebunden vorliegen, könnten die gemessenen IgE-anti-IL-

24-Werte niedriger sein. Daher ist in weiteren Experimenten zu klären, ob das IgE monovalent ist wie bei unseren Messungen angenommen.

4.3 IL-24 als potenzielles Autoantigen

Um Ag zu identifizieren, die letztendlich auch zu Hautsymptomen bei der Urtikaria führen, müssen Aag gewählt werden, die sowohl in der Haut vorhanden sind, aber auch im Serum für das mastzellgebundene IgE erreichbar sind. Von den 226 (222 + 4) Ag wurden acht Ag identifiziert, die dieses Kriterium erfüllten: Erstens von der Haut gebildet zu werden und zweitens löslich sind und somit zugänglich für die Mastzellen, so dass eine Mastzellaktivierung möglich wird. Von den acht Ag konnte letztlich IL-24 identifiziert werden, welches bei der CSU als potenzielles Aag die wichtigste Rolle spielt. Gründe hierfür waren zum einen, dass das IL-24 ein zugängliches und in der Haut exprimiertes Aag ist. Zum anderen konnte es in allen Seren der CSU-Patienten nachgewiesen werden. Zudem hatte das IgE-anti-IL-24 mit ca. 1,1 % (relativ zum gemessenen Gesamt-IgE) den höchsten im Serum gemessenen Wert bei CSU-Patienten. Im nächsten Schritt wäre die Bestimmung des Grenzwertes, ab welchen Serum-Werten das IgE-anti-IL-24 eine klinische Relevanz für einzelne CSU-Patienten hat, interessant. Dies war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit. In anderen Arbeiten, die sich auch mit Aag beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass ein hohes Verhältnis von spezifischem beta-Lactam-IgE zum Gesamt-IgE (Werte > 0,2 %) bei Patienten eine Antibiotikaassoziierte Reaktion auslösen kann (47).

4.4 Die Funktion des IL-24

Die Arbeit zeigt, dass IgE-anti-IL-24 bei Patienten mit CSU erhöht ist. Welche biologische Funktion das Zytokin IL-24 im Körper hat, ist nicht abschließend geklärt. IL-24 gehört in die Familie der IL-10 Zytokine. IL-24 wurde eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen zugeschrieben, da bei hohen Blut-Werten eine positive Korrelation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF- α und Interleukin-6 und eine negative Korrelation mit dem anti-inflammatorischen Zytokin Interleukin-10 gefunden werden konnte (48).

Auch in der Wundheilung könnte IL-24 involviert sein. Bei Patienten mit diabetischem Fußulcus konnte IL-24 zusammen mit IL-20 und IL-22 die Wundheilung positiv beeinflussen. In

Experimenten mit Mäusen, bei denen die Rezeptoren für die o. g. Zytokine fehlten, konnte gezeigt werden, dass die Wundheilung bei diesen Mäusen verzögert war (49).

Darüber hinaus hat das IL-24 eine supprimierende Wirkung auf verschiedene Tumorzellen. sIL-24, eine Isoform von IL-24, scheint durch die Hochregulation des Bax/Bcl-2 Verhältnisses, durch die Freisetzung von Cytochrom c und durch die Expression der gespaltenen Caspase-3 eine proapoptotische Aktivität zu haben, die hauptsächlich über den mitochondrialen Weg erfolgt (50). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das IL-24 die Immunogenität der myelogenen Leukämiezellen modelliert (51). In Mausexperimenten führte das IL-24 zur Wachstumsverzögerung der transplantierten Leukämiezellen durch das Herunterregulieren des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), der Unterscheidungsgruppen CD31 und CD34, des Faktors CD147, des Kollagen IV und der Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2 und MMP-9) (51). Eine weitere Studie zeigte, dass die Melanomzellen auf das Zytostatikum Temozolomid bei Anwesenheit von IL-24 verstärkt apoptotisch reagierten und weniger Resistenzen gegen das Zytostatikum zeigten (52). Das IL-24 induzierte in den Melanomzellen die Expression von proapoptotischen Proteinen (B-celllyphoma-2 (Bcl-2)-like Protein 4, phosphoryliertes Protein, γ -H2A histon family member X) und reduzierte die Expression von antiapoptotischen Proteinen (Bcl-2, myeloid cell leukemia-1 und nuclear factor- κ B) (52).

Die endgültige pathogenetische Rolle von IL-24 ist somit noch nicht eindeutig geklärt, IL-24 ist aber in eine Reihe von inflammatorischen Prozessen miteingebunden. Wir konnten erstmals in unseren Untersuchungen die Assoziation mit der Urtikaria herstellen. Welche Rolle jedoch das IL 24 bei der Urtikaria pathophysiologisch spielen könnte, kann man anhand unserer Daten nicht erklären.

4.5 IgE gegen das Schilddrüsenenzym Thyreoperoxidase

Frühere Arbeiten von Kolkhier et al. (21) weisen darauf hin, dass eine Komorbidität zwischen der CSU und der Autoimmunthyreopathie besteht. Neben erhöhten IgG-anti-TPO (IgG-Ak gegen das Schilddrüsenenzym Thyreoperoxidase) im Blut ist auch das IgE-anti-TPO erhöht, wenn auch mit geringerer Evidenz (21). Mithilfe eines direkten ELISAs konnten Shin et al. (53) nachweisen, dass Patienten mit akuter Aspirin-Intoleranz Urtikaria (aAIU) und chronischer

Aspirin-Intoleranz Urtikaria (cAIU) signifikant höhere serumspezifische IgE-Ak gegen TPO aufwiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

In den Proteinarray-Experimenten konnten keine Reaktivität von IgE gegen das Schilddrüsenenzym TPO nachgewiesen werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Wir gehen am ehesten davon aus, dass das IgE-Signal gegen die TPO durch die IgG-Ak unterdrückt wird. Es ist auch möglich, dass das IgE-anti-TPO eine höhere Bindungsaffinität zu anderen Autoantigenen im Proteinarray hatte und deswegen die Bindung in einem anderen Spot erfolgte.

4.6 Autoimmunität als Pathomechanismus

CSU Patienten hatten im Gegensatz zu gesunden Kontrollen erhöhte IgE-Aak (IgE-anti-IL-24), IgG-Aak gegen IL-24 (Anti-IL-24-IgG) waren nicht erhöht. Wir wissen, dass IgG-Ak sowohl bei der Pathogenese der CSU (28), als auch bei der Entstehung weiterer autoimmunvermittelter Erkrankungen eine Rolle spielen können (21, 25). Eine CSU kann neben einer Reaktivität von IgE-Aak auf lokale Aag im Sinne einer Autoimmunität Typ I auch getriggert werden, indem die IgG-Ak gegen IgE-Ak oder gegen die Mastzellrezeptoren binden und die Mastzellen aktivieren (Autoimmunität Typ II) (54). Die Erkenntnisse über die erhöhten IgE-anti-IL-24 Werte bei CSU-Patienten würden einer Autoimmunität Typ I entsprechen.

4.7 Krankheitsaktivität und basophile Zellen

Wir konnten zeigen, dass hohe IgE-anti-IL-24 Werte mit niedrigeren Zahlen an basophilen Zellen einhergehen. Wir gehen davon aus, dass bei hohen IgE-anti-IL-24 Werten und bei hoher Krankheitsaktivität die basophilen Zellen aktiviert werden und dies zu niedrigeren Werten von basophilen Zellen im Blut der Patienten führt. Die Zahl der basophilen Zellen kann sich im Verlauf der Krankheitsaktivität verändern und auch zunehmen (55). Eine Aktivierung der basophilen Zellen konnte bei Patienten mit aAIU und cAIU gezeigt werden. Shin et al. (53) konnten mittels einer Durchflusszytometrie nachweisen, dass bei Patienten mit aAIU und cAIU die Expression von CD203c als Aktivitätsmarker auf basophilen Zellen signifikant höher war als bei gesunden Kontrollen. Die erhöhte Expression von FcεRI-Rezeptoren sowie die Hochregulation von CD203c kann ein Prädiktor für eine schwere CU sein (56).

4.8 Hepatitis-B-Impfung und CSU

Die Untersuchungen der Seren von Patienten mit CSU zeigten signifikant niedrigere IgE-anti-IL-24 Werte bei ausreichender Schutzimpfung gegen Hepatitis B. Dieser Zusammenhang in Verbindung mit CSU wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Es sind Fälle beschrieben, dass Immunisierungen gegen Hepatitis-B mit der Entstehung verschiedener autoimmunvermittelter Erkrankungen wie z. B. SLE assoziiert sein können (57, 58). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu verstehen, wie Impfungen autoimmunvermittelte chronische Erkrankungen, wie auch im Speziellen die CSU, im Krankheitsverlauf beeinflussen. Es ist möglich, dass durch die Impfung gegen Hepatitis-B das Immunsystem kurzzeitig abgelenkt wird und aus diesem Grund weniger IgE-Antikörper gegen Aag produziert werden.

4.9 Ängstlichkeit und Depressionen bei CSU

Wir haben uns die begleitenden psychopathologischen Symptome bei Patienten mit CSU angeschaut. Staubach et al. (59) beschreibt, dass Patienten mit CSU vermehrt an psychischen Symptomen und emotionalem Stress leiden können. Am stärksten können Patienten mit CSU an Angststörungen, speziell an Phobien, gefolgt von Depressionen und von somatoformen Störungen leiden (59). Die Gegenüberstellung von IgE-anti-IL-24 Serumwerten und HADS-Scores ergab eine negative Korrelation. Patienten mit hohen IgE-anti-IL-24 Serumwerten hatten niedrigere HADS-Scores. Dies ist eine interessante Beobachtung, da es auch hier zu einer therapeutischen Konsequenz führen könnte. In einer Arbeit von Weller et al. (60) wurden die Scores für Depression und Ängstlichkeit bei nichtautoreaktiver CSU und autoreaktiver CSU untersucht. Die Scores für Ängstlichkeit und Depression zeigten sich bei Patienten mit autoreaktiver CSU niedriger als bei Patienten mit nichtautoreaktiver CSU. Insgesamt wurde in dieser Arbeit postuliert, dass bei der autoreaktiven CSU ein anderes Krankheitsmuster vorliegen könnte und Patienten weniger Komorbiditäten zu psychischen Erkrankungen aufweisen als Patienten mit nichtautoreaktiver CSU (60).

Wenn in weiteren Arbeiten die Korrelation von hohen IgE-anti-IL-24 Serumwerten mit niedrigere HADS-Scores bestätigt werden könnte, wäre dies eine Option, Patienten mit einer Neigung zu Depressionen frühzeitig mit einem Biomarker zu identifizieren. Dies würde zu einer engmaschigeren und professionelleren psychologischen Betreuung und damit zu einer deutlich besseren Lebensqualität der Patienten führen.

4.10 Hohe Triiodthyronin Serumwerten sind mit niedrigen IgE-anti-IL-24 assoziiert

Die Arbeit von Kim et al. (61) untersuchte den therapeutischen Effekt von Levothyroxin auf die Hypothyreose bei Patienten mit CU und Autoimmunthyreopathie. Bei zwei von zehn Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis verschlechterte sich die CU nach der Therapie mit Levothyroxin (T4). Patienten mit Morbus Basedow zeigten nach der Therapie mit einem Thyreostatikum keinen Effekt auf die Klinik der CU (61). Wie Kolkhier et al. (21) kam auch Kim et al. (61, 62) zum Ergebnis, dass ein Zusammenhang zwischen CU und der Autoimmunthyreopathie bestehen könnte. In dieser Arbeit waren Patienten mit hohen T3 Serumwerten mit niedrigeren IgE-anti-IL-24 assoziiert. Patienten mit niedrigen und normalen T3 Serumwerten zeigten höhere IgE-anti-IL-24 Serumwerte. Eine hohe hyperthyreote Stoffwechsellage scheint mit niedrigeren IgE-anti-IL-24 Serumwerten einherzugehen. Um diesen Zusammenhang besser zu verstehen, müssten jedoch weitere Untersuchungen erfolgen.

4.11 Anti-IgE als Therapieoption

Bei verschiedenen entzündlichen dermatologischen Erkrankungen kamen in den letzten Jahren viele Ak-basierende Therapien auf den Markt, wie bei der Psoriasis (TNF-alpha, IL-17, IL-23), bei der atopischen Dermatitis (IL-4/IL-13) oder auch bei der Urtikaria (Anti-IgE). Speziell für die chronische Urtikaria wird in der S3-Leitlinie die Behandlung mit Omalizumab (Anti-IgE) empfohlen (6).

Omalizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Ak gegen IgE-Ak. Studien belegen, dass die Behandlung mit Omalizumab dosisabhängig zur signifikanten Verbesserung der klinischen Symptome führt im Vergleich zur Placebo-Gruppe (17, 63, 64). In der S3-Leitlinie für CU wird empfohlen, dass Patienten alle vier Wochen zusätzlich Omalizumab 300 mg i.v. erhalten sollen, wenn sie unter einer hochdosierten Therapie mit H₁-Antihistaminikern nicht symptomfrei werden (6). Die Anti-IgE-Ak binden und neutralisieren IgE-Aak. Dies führt zur Reduktion von frei zirkulierenden IgE-Ak im Blut. Dies führt natürlich bei weniger frei zirkulierenden IgE-Ak auch zur Reduktion von IgE-anti-IL24-Aak. Die Arbeit von Schmetzer et al. (4) hat gezeigt, dass die Mastzellen durch IgE-IL-24-Aak aktiviert werden können. So führt auch hier die Therapie mit Anti-IgE sicherlich zu einer Verminderung von IgE-anti-IL24-Aak. In

Abwesenheit von IgE-anti-IL-24-Ak würden die Mastzellen nicht mehr aktiviert werden. Die Stabilisierung der Mastzellen würde dann schließlich zur Symptomreduktion bei den Patienten führen. Ziel in der Ak-basierten Therapie ist jedoch, so spezifisch wie möglich zu blockieren. Insofern sind therapeutische Weiterentwicklungen in diesem Bereich klinisch relevant.

4.12 Stärken und Schwächen der Arbeit

Ein großer Vorteil unserer Arbeit sind die Analysen anhand eines großen Patientenkollektivs. Für unsere Arbeit wurde eine sehr große Anzahl an Patientenseren mit CSU untersucht und diese mit Seren von gesunden Kontrollprobanden verglichen.

In unserer Arbeit wurde eine umfangreiche Messanalytik mit einem Proteinarray benutzt, der eine große Anzahl von menschlichen Aag analysiert, inklusive IgE-Kontrollgruppen und gesunde Probanden um Effekte auszuschalten, die auf hohen IgE Leveln basieren.

Zudem wurden die Daten aus den Proteinarray Messungen mit den Daten aus den ELISA-Analysen verglichen. Durch die Anzahl der Probanden und durch den Vergleich der Ergebnisse (Proteinarray- und ELISA-Ergebnisse) konnten wir unsere Erkenntnisse bestätigen.

Schwächen unserer Analysen waren, dass wir bei unseren Untersuchungen niedrige Serumwerte von IgE-anti-IL-24 auch bei gesunden Kontrollen finden konnten. Die geringe Konzentration von IgE-anti-IL-24 bei gesunden Kontrollen verursachen jedoch keine klinischen Symptome. Dies spricht dafür, dass die Entstehung der Beschwerden abhängig von der Konzentration ist. Pathophysiologisch jedoch ist vorstellbar, dass weitere Faktoren dazukommen müssen, um eine klinisch relevante CSU auszulösen.

Wir haben uns für ein Proteinarray mit den ca. 9000 häufigsten menschlichen Proteinen entschieden. Das Proteinarray bildet jedoch nicht alle menschlichen Proteine ab. Daher können wir letztendlich nicht festlegen, dass das IL-24 den Hauptfaktor in der Pathogenese der CSU darstellt. Aber wir konnten erstmalig an einem sehr großen Patientenkollektiv nachweisen, dass das IL-24 eine Rolle bei Patienten mit CSU spielt. Dies ist in der Entwicklung von weiteren Therapieformen eine sehr spannende Entdeckung. Durch genauere Analyse der involvierten Zytokine bei der Urtikaria könnten so zielgenauere Therapien entwickelt werden.

4.13 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend können wir feststellen, dass IL-24 ein häufiges und spezifisches Aag ist, welches bei der Pathogenese der CSU eine Rolle spielt. Zudem korreliert eine hohe Serumkonzentration von IgE-anti-IL-24 mit der CSU Krankheitsaktivität. Hohe relative IgE-anti-IL-24-Werte korrelierten negativ mit der Anzahl von basophilen Zellen im Serum. CSU-Patienten mit Hepatitis-B Schutzimpfung haben niedrigere IgE-anti-IL-24 Werte. CSU-Patienten mit hohen IgE-anti-IL-24-Werten gaben an, weniger depressiv und ängstlich zu sein. Hohe Triiodthyronin Serumwerte waren mit niedrigen IgE-anti-IL-24 assoziiert. In Zukunft könnten neue Methoden zur Messung von autoreaktivem IgE und im Speziellen von IgE-anti-IL-24 etabliert werden. Dies könnte dabei helfen, die Patienten mit einer IgE-anti-IL-24-vermittelten CSU früher zu erkennen, Patienten selektiver zu behandeln und bei einer medikamentösen Therapie das Ansprechen und die Krankheitsaktivität effektiver zu überwachen. Insgesamt sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Pathogenese der CSU besser zu verstehen und die Krankheit besser zu kontrollieren.

Literaturverzeichnis

1. ThermoFischer. Human Protein Microarrays Overview [Internet]: Thermo Fischer Scientific; 2018 [zitiert am 13.07.2018] [Available from: <http://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-microarrays/human-protein-microarrays-overview.html>].
2. ThermoFischer. Overview of ELISA [Internet]: Thermo Fisher Scientific; 2018 [zitiert am 12.07.2018] [Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>].
3. Grattan C. Autoimmune chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(3):1165-6.
4. Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, et al. IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2017.
5. Amar SM, Dreskin SC. Urticaria. *Prim Care.* 2008;35(1):141-57, vii-viii.
6. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Abdul Latiff AH, Baker D, Ballmer-Weber B, et al. The EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO Guideline for the Definition, Classification, Diagnosis and Management of Urticaria. The 2017 Revision and Update. *Allergy.* 2018.
7. Magerl M, Altrichter S, Borzova E, Gimenez-Arnau A, Grattan CE, Lawlor F, et al. The definition, diagnostic testing, and management of chronic inducible urticarias - The EAACI/GA(2) LEN/EDF/UNEV consensus recommendations 2016 update and revision. *Allergy.* 2016;71(6):780-802.
8. Lapi F, Cassano N, Pegoraro V, Cataldo N, Heiman F, Cricelli I, et al. Epidemiology of chronic spontaneous urticaria: results from a nationwide, population-based study in Italy. *Br J Dermatol.* 2016;174(5):996-1004.
9. Cherrez Ojeda I, Vanegas E, Felix M, Mata V, Cherrez S, Simancas-Racines D, et al. Etiology of chronic urticaria: the Ecuadorian experience. *World Allergy Organ J.* 2018;11(1):1.
10. Kolkhir P, Church MK, Weller K, Metz M, Schmetzer O, Maurer M. Autoimmune chronic spontaneous urticaria: What we know and what we do not know. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1772-81 e1.
11. Minciullo PL, Cascio A, Barberi G, Gangemi S. Urticaria and bacterial infections. *Allergy Asthma Proc.* 2014;35(4):295-302.

12. Imbalzano E, Casciaro M, Quartuccio S, Minciullo PL, Cascio A, Calapai G, et al. Association between urticaria and virus infections: A systematic review. *Allergy Asthma Proc.* 2016;37(1):18-22.
13. Ventura MT, Napolitano S, Menga R, Cecere R, Asero R. Anisakis simplex hypersensitivity is associated with chronic urticaria in endemic areas. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160(3):297-300.
14. Kolkhir P, Balakirski G, Merk HF, Olisova O, Maurer M. Chronic spontaneous urticaria and internal parasites--a systematic review. *Allergy.* 2016;71(3):308-22.
15. Dionigi PC, Menezes MC, Forte WC. A prospective ten-year follow-up of patients with chronic urticaria. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2016;44(4):286-91.
16. de Montjoye L, Herman A, Nicolas JF, Baeck M. Treatment of chronic spontaneous urticaria: Immunomodulatory approaches. *Clin Immunol.* 2017.
17. Zhao ZT, Ji CM, Yu WJ, Meng L, Hawro T, Wei JF, et al. Omalizumab for the treatment of chronic spontaneous urticaria: A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(6):1742-50 e4.
18. Bar-Sela S, Reshef T, Mekori YA. IgE antithyroid microsomal antibodies in a patient with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(6):1216-7.
19. Altrichter S, Peter HJ, Pisarevskaja D, Metz M, Martus P, Maurer M. IgE mediated autoallergy against thyroid peroxidase--a novel pathomechanism of chronic spontaneous urticaria? *PLoS One.* 2011;6(4):e14794.
20. Irani C, Jammal M, Asmar G, Hajj H, Halaby G. Chronic urticaria and autoimmune thyroiditis. *J Med Liban.* 2012;60(2):88-90.
21. Kolkhir P, Metz M, Altrichter S, Maurer M. Comorbidity of chronic spontaneous urticaria and autoimmune thyroid diseases: A systematic review. *Allergy.* 2017;72(10):1440-60.
22. Missaka RF, Penatti HC, Silveiras MR, Nogueira CR, Mazeto GM. Autoimmune thyroid disease as a risk factor for angioedema in patients with chronic idiopathic urticaria: a case-control study. *Sao Paulo Med J.* 2012;130(5):294-8.
23. Berghi NO. Immunological Mechanisms Implicated in the Pathogenesis of Chronic Urticaria and Hashimoto Thyroiditis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2017;16(4):358-66.
24. Mincer DL, Jialal I. Thyroid, Hashimoto Thyroiditis. *StatPearls. Treasure Island (FL)2018.*

25. Kolkhir P, Pogorelov D, Olisova O, Maurer M. Comorbidity and pathogenic links of chronic spontaneous urticaria and systemic lupus erythematosus--a systematic review. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(2):275-87.
26. Kolkhir P, Borzova E, Grattan C, Asero R, Pogorelov D, Maurer M. Autoimmune comorbidity in chronic spontaneous urticaria: A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2017;16(12):1196-208.
27. Hatada Y, Kashiwakura J, Hayama K, Fujisawa D, Sasaki-Sakamoto T, Terui T, et al. Significantly high levels of anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the degranulation of basophils from chronic urticaria patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161 Suppl 2:154-8.
28. Ulambayar B, Chen YH, Ban GY, Lee JH, Jung CG, Yang EM, et al. Detection of circulating IgG autoantibody to FcepsilonRIalpha in sera from chronic spontaneous urticaria patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017.
29. Kaplan AP, Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):777-87.
30. Ben-Shoshan M, Blinderman I, Raz A. Psychosocial factors and chronic spontaneous urticaria: a systematic review. *Allergy*. 2013;68(2):131-41.
31. Staubach P, Eckhardt-Henn A, Dechene M, Vonend A, Metz M, Magerl M, et al. Quality of life in patients with chronic urticaria is differentially impaired and determined by psychiatric comorbidity. *Br J Dermatol*. 2006;154(2):294-8.
32. Choi WS, Lim ES, Ban GY, Kim JH, Shin YS, Park HS, et al. Disease-specific impairment of the quality of life in adult patients with chronic spontaneous urticaria. *Korean J Intern Med*. 2018;33(1):185-92.
33. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science; 2001;Kapitel 12-6 - 12-12.
34. Gell PGH, Coombs RRA. *Clinical aspects of immunology*. 2nd ed. Oxford, Edinburgh,: Blackwell Scientific; 1968. xxix, 1356 p. p.
35. Hermes B, Prochazka AK, Haas N, Jurgovsky K, Sticherling M, Henz BM. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(2 Pt 1):307-14.

36. Kay AB, Ying S, Ardelean E, Mlynek A, Kita H, Clark P, et al. Elevations in vascular markers and eosinophils in chronic spontaneous urticarial weals with low-level persistence in uninvolved skin. *Br J Dermatol*. 2014;171(3):505-11.
37. Kay AB, Clark P, Maurer M, Ying S. Elevations in T-helper-2-initiating cytokines (interleukin-33, interleukin-25 and thymic stromal lymphopoietin) in lesional skin from chronic spontaneous ('idiopathic') urticaria. *Br J Dermatol*. 2015;172(5):1294-302.
38. Ito Y, Satoh T, Takayama K, Miyagishi C, Walls AF, Yokozeki H. Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. *Allergy*. 2011;66(8):1107-13.
39. Kolkhir P, Andre F, Church MK, Maurer M, Metz M. Potential blood biomarkers in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(1):19-36.
40. Lin W, Zhou Q, Liu C, Ying M, Xu S. Increased plasma IL-17, IL-31, and IL-33 levels in chronic spontaneous urticaria. *Sci Rep*. 2017;7(1):17797.
41. Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*. 2000;149:III-IV, 1-413.
42. PerkinElmer. DELFIA Time-resolved Fluorescence Assays [Internet]: PerkinElmer Inc. ; 2018 [zitiert am 12.07.2018] [Available from: <http://www.perkinelmer.de/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/delfia/delfia-trf-assays.html>].
43. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 2000;289(5485):1760-3.
44. Wyss M. [From psychosomatic disorder to autoimmune disease--50 years urticaria and Quincke edema]. *Praxis (Bern 1994)*. 1998;87(40):1325-9.
45. Ettinger R, Karnell JL, Henault J, Panda SK, Riggs JM, Kolbeck R, et al. Pathogenic mechanisms of IgE-mediated inflammation in self-destructive autoimmune responses. *Autoimmunity*. 2017;50(1):25-36.
46. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;67(6):361-70.
47. Vultaggio A, Virgili G, Gaeta F, Romano A, Maggi E, Matucci A. High serum beta-lactams specific/total IgE ratio is associated with immediate reactions to beta-lactams antibiotics. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121857.
48. Shi Y, Ma Q, Yuan Y, Ma X, Kong L, Liu Y, et al. Interleukin-24 Concentrations Not Related with Age, but Affect Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Differently in Healthy Donors. *Clin Lab*. 2017;63(9):1379-91.

49. Kolumam G, Wu X, Lee WP, Hackney JA, Zavala-Solorio J, Gandham V, et al. IL-22R Ligands IL-20, IL-22, and IL-24 Promote Wound Healing in Diabetic db/db Mice. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170639.
50. Valiyari S, Salami M, Mahdian R, Shokrgozar MA, Oloomi M, Mohammadi Farsani A, et al. sIL-24 peptide, a human interleukin-24 isoform, induces mitochondrial-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;80(3):451-9.
51. Yu X, Miao J, Xia W, Gu ZJ. Immunogenicity moderation effect of interleukin-24 on myelogenous leukemia cells. *Anticancer Drugs*. 2018;29(4):353-63.
52. Liang Z, Yang CS, Gu F, Zhang LS. A conditionally replicating adenovirus expressing IL-24 acts synergistically with temozolomide to enhance apoptosis in melanoma cells in vitro. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4185-9.
53. Shin YS, Suh DH, Yang EM, Ye YM, Park HS. Serum Specific IgE to Thyroid Peroxidase Activates Basophils in Aspirin Intolerant Urticaria. *J Korean Med Sci*. 2015;30(6):705-9.
54. Church MK, Kolkhir P, Metz M, Maurer M. The role and relevance of mast cells in urticaria. *Immunol Rev*. 2018;282(1):232-47.
55. Oliver ET, Sterba PM, Saini SS. Interval shifts in basophil measures correlate with disease activity in chronic spontaneous urticaria. *Allergy*. 2015;70(5):601-3.
56. Ye YM, Yang EM, Yoo HS, Shin YS, Kim SH, Park HS. Increased level of basophil CD203c expression predicts severe chronic urticaria. *J Korean Med Sci*. 2014;29(1):43-7.
57. Vadala M, Poddighe D, Laurino C, Palmieri B. Vaccination and autoimmune diseases: is prevention of adverse health effects on the horizon? *EPMA J*. 2017;8(3):295-311.
58. Orbach H, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G. Vaccines and autoimmune diseases of the adult. *Discov Med*. 2010;9(45):90-7.
59. Staubach P, Dechene M, Metz M, Magerl M, Siebenhaar F, Weller K, et al. High prevalence of mental disorders and emotional distress in patients with chronic spontaneous urticaria. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(5):557-61.
60. Weller K, Koti I, Makris M, Maurer M. Anxiety and depression seem less common in patients with autoreactive chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(8):870-3.
61. Kim DH, Sung NH, Lee AY. Effect of Levothyroxine Treatment on Clinical Symptoms in Hypothyroid Patients with Chronic Urticaria and Thyroid Autoimmunity. *Ann Dermatol*. 2016;28(2):199-204.

62. Kim YS, Han K, Lee JH, Kim NI, Roh JY, Seo SJ, et al. Increased Risk of Chronic Spontaneous Urticaria in Patients With Autoimmune Thyroid Diseases: A Nationwide, Population-based Study. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017;9(4):373-7.
63. Ghazanfar MN, Holm JG, Thomsen SF. Effectiveness of omalizumab in chronic spontaneous urticaria assessed with patient-reported outcomes: a prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018.
64. Bernstein JA, Kavati A, Tharp MD, Ortiz B, MacDonald K, Denhaerynck K, et al. Effectiveness of omalizumab in adolescent and adult patients with chronic idiopathic/spontaneous urticaria: a systematic review of 'real-world' evidence. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(4):425-48.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Fatih Alexander Topal, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„IL-24 ist ein häufiges und spezifisches IgE-Autoantigen bei Patienten mit chronisch spontaner Urtikaria“

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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Fatih Alexander Topal hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, Maurer M. IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria. J Allergy Clin Immunol. 2017.

Beitrag im Einzelnen:

Entwicklung und Nutzung eines Sandwich-ELISAs zur Messung von Patientenseren. Mit den Messungen der Seren aus CSU-Patienten und gesunden Kontrollen mittels Sandwich-ELISA sind die Abbildungen 7 und 8 in der Publikation entstanden. Mit den Auswertungen der gewonnenen Daten aus den Proteinarray-Messungen sind die Abbildungen 5 und 6 entstanden.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikationen

Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, Maurer M.

IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Dec 5. pii: S0091-6749(17)31875-4. doi: 10.1016/j.jaci.2017.10.035.

Abstracts

IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria.

Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, Maurer M.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Konferenz: 44th Annual Meeting of the ADF 2017 – in Göttingen

Detection of proteins regulating mast cell adhesion and proliferation.

Topal FA, Schmetzer O, Freier D, Lakin E, Shamshiraz N, Preusse P, Maurer M.

März 2017

DOI: 10.13140/RG.2.2.27859.58408

Konferenz: 44th Annual Meeting of the ADF 2017 – in Göttingen

The gasotransmitters nitric oxide and hydrogen sulphide block the degranulation of mast cells.

März 2017

DOI: 10.13140/RG.2.2.31215.02723

Konferenz: 44th Annual Meeting of the ADF 2017 – in Göttingen

Danksagung

An dieser Stelle möchte an alle diejenigen danken, die mich während meines Promotionsvorhabens auf vielfältige Weise unterstützt und mir diese Doktorarbeit ermöglicht haben. An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter und Betreuerin, Frau PD Dr. med. Maja Hofmann für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und für die exzellente und allumfassende Betreuung bedanken.

Ich danke auch Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Oliver Schmetzer für seine freundliche Betreuung im Labor und für seine exzellente Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Ein ganz spezielles Dankeschön auch an die technischen Assistentin Inga Wyrosiak und an das gesamte Laborteam für ihre freundliche Hilfe und Unterstützung bei allen technischen und methodischen Fragen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Prof. Marcus Maurer, bei Prof. Torsten Zuberbier und bei Prof. Joachim Fluhr bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Promotionsarbeit erfolgreich abzuschließen.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie und Greg bedanken, die mir während meines Studiums und während meiner Promotion beigestanden haben und stets an mich geglaubt haben. Vielen Dank!