

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

DISSERTATION

Charakterisierung des IgE von Patienten mit Chronischer
Spontaner Urtikaria hinsichtlich der Autoreaktivität und
Lipophilie

Characterization of IgE from patients with chronic spontaneous
urticaria with regard to autoreactivity and lipophilicity

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisa Lakin

aus Hannover

Datum der Promotion: 05.03.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ORIGINALARBEITEN, DIE DIESER PROMOTION ZUGRUNDE LIEGEN	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ABSTRACT.....	9
ZUSAMMENFASSUNG.....	11
EINLEITUNG.....	13
METHODIK	16
ERGEBNISSE.....	19
DISKUSSION.....	22
LITERATURVERZEICHNIS	27
EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	31
ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN.....	33
AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST.....	35
PUBLIKATIONEN	39
LEBENS LAUF	55
PUBLIKATIONS LISTE.....	57
DANKSAGUNG.....	59

ORIGINALARBEITEN, DIE DIESER PROMOTION ZUGRUNDE
LIEGEN

Publikation 1:

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2:

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD – Atopische Dermatitis

Anti-FcεRI-Autoantikörper – Autoantikörper gegen den FcεRI

Anti-IgE-Autoantikörper – Autoantikörper gegen IgE

ASST – autologer Serumhauttest; Autologous serum skin test

CDR3 – Complementary determining region 3

CSU – Chronische Spontane Urtikaria

CU-Q₂₀L – Chronic Urticaria Quality of Life Questionnaire

FcεRI – Hochaffiner IgE-Rezeptor

IgE-anti-dsDNA – IgE gegen doppelsträngige DNA

IgE-anti-GFP – IgE gegen „green fluorescent protein“

IgE-anti-IL-24 – IgE gegen IL-24

IgE-anti-TPO – IgE gegen TPO

IL-24 – Interleukin-24

PCA – Hauptkomponentenanalyse; Principal component analyse

PSCMCs – Mastzellen, die aus peripheren CD34⁺ Stammzellen differenziert wurden

ROC – Receiver Operating Characteristics

TPO – Thyreoperoxidase

UAS7 – Urtikariaaktivitätstest; Urticaria activity score

ABSTRACT

Chronic spontaneous urticaria (CSU) is a skin disease related to autoreactive IgE in at least a subgroup of patients. The efficacy of omalizumab (anti-IgE) and increased IgE levels in patients with CSU suggest autoallergic mechanisms. However, the nature of this autoreactive IgE remains poorly characterized. This investigation had following objectives: first, to quantify autoreactive IgE from CSU patients; second, to identify autoallergic targets of IgE in those patients; third, to compare the target patterns with targets of IgE from healthy controls, and fourth, to investigate the physiochemical nature of autoreactive IgE. IgE autoreactivity was assessed in sera from seven CSU and seven healthy donors by using protein microarray analyses. Autoantigen recognition patterns were identified using principal component analysis (PCA) and heatmap visualization. Sera of 1062 patients with CSU and 482 healthy control subjects were tested in an IgE-anti-IL-24-specific ELISA to investigate the association of IgE-anti-IL-24 with CSU. IgE-Lipophilicity of 232 CSU patients and 173 healthy controls was assessed in an IgE-Lipophilicity Assay using NanoOrange reagent. More than 200 IgE autoantigens were found in patients with CSU that were not found in control subjects. CSU autoreactive IgE differed from healthy control IgE by recognizing different and more autoantigens (226 vs. 34; $P = 0.01$). The autoreactive proportion of IgE from the CSU patients was $62\% \pm 37\%$, 1000-fold higher than that of healthy controls $0.03\% \pm 0.008\%$ ($P = 0.0006$). Of the 31 IgE autoantigens detected in more than 70% of patients, eight were soluble or membrane bound and expressed in the skin. Of these, only IgE autoantibodies to interleukin-24 (IL-24) were found in all patients with CSU. *In vitro* studies showed that IL-24 is able to lead to release of histamine from human mast cells sensitized with purified IgE from patients with CSU but not from control subjects. By using ELISA, mean \pm SD levels of IgE-anti-IL-24 were 0.52 ± 0.24 IU/ml in patients with CSU and 0.27 ± 0.08 IU/ml in control subjects, with 80% of patients with CSU but only 20% of control subjects having levels greater than 0.33 IU/ mL ($P < .0001$). IgE-anti-IL-24 showed acceptable predictive properties for CSU, with a likelihood ratio of 3.9. Clinically, IgE-anti-IL-24 levels showed an association with disease activity. For lipophilic IgE, the median (with 10–90% percentiles) serum level was 39% (38–40%) in 232 CSU patients, 1.4-fold higher than the 28% (26–29%) of 173 healthy controls ($P < 0.0001$). Furthermore, lipophilicity correlated with autoreactivity ($r = 0.8$; $P < 0.0001$), connecting these two observed

features. We believe that these novel observations about CSU autoreactive IgE, particularly the finding that it is more lipophilic than that of IgE from healthy individuals will lead to the development of new diagnostic tests and therapies for autoreactive IgE-mediated diseases.

462 words

ZUSAMMENFASSUNG

Chronische spontane Urtikaria (CSU) ist eine Hauterkrankung, deren klinisches Bild von Quaddeln und/oder Angioödemem mit starkem Juckreiz geprägt ist. Diese Symptome treten spontan wiederkehrend in einem Zeitraum von mindestens sechs Wochen auf. Die Diagnose wird meist durch die imponierende Klinik, sowie eine entsprechende Anamnese gestellt und eine symptomatische Therapie wird durch die Gabe von hochdosierten H1-Antihistaminika der zweiten Generation, Omalizumab und/oder Ciclosporin A durchgeführt. Die genaue Pathophysiologie der CSU ist bis heute nicht bekannt, doch vor allem autoallergische Mechanismen, also die Aktivierung und anschließende Degranulation mit Mediatorfreisetzung von Mastzellen durch autoreaktives IgE, spielen in CSU Patienten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Symptome. Ziel dieser Arbeit ist die genauere Untersuchung des IgE von CSU Patienten hinsichtlich der Autoreaktivität und der damit verbundenen Eigenschaft der Lipophilie, um ein besseres Verständnis der Erkrankung und insbesondere der pathophysiologischen Mechanismen zu erlangen. Zur Quantifizierung und Identifizierung der IgE Autoantigene, sowie zur Bestimmung des gesamt autoreaktiven IgE Serumspiegels wurde eine systematische Auto-IgEome Analyse mittels Protein-Mikroarray durchgeführt. Es folgte die Bestimmung von Serumspiegeln des neu identifizierten, CSU-spezifischen IgE-Autoantikörpers IgE-anti-IL-24 in einer großen Studienpopulation mithilfe eines IgE-anti-IL-24 Tests. Durch Degranulationstests mit Mastzellen (aus peripheren CD34⁺ Stammzellen differenziert) wurde die Fähigkeit zur Mastzellaktivierung durch IgE-anti-IL-24 überprüft. Die Lipophilie des IgE von CSU Patienten wurde mit einem neuen IgE-Lipophilie Test mit der Lipophilie des IgE von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Die Ergebnisse der Auto-IgEome Analyse zeigten, dass IgE von CSU Patienten etwa sechsfach mehr Autoantigene und andere Autoantigene als das IgE von gesunden Kontrollpersonen erkennt und im Durchschnitt 60% des Serum-IgE der CSU Patienten autoreaktiv ist. IgE-anti-IL-24 kann, wenn es auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden ist und Interleukin-24 (IL-24) präsent ist, zur Mastzelldegranulation führen. Zudem ist IgE-anti-IL-24 ein geeigneter Krankheitsmarker der CSU und korreliert mit der Krankheitsaktivität. Erhöhte Lipophilie, gegenüber dem IgE von gesunden Kontrollpersonen, ist eine Eigenschaft des IgE von CSU Patienten. Die beiden untersuchten Eigenschaften Autoreaktivität und Lipophilie des IgE konnten durch eine

Korrelation in Verbindung gebracht werden, wodurch IgE-Lipophilie als ein Marker für IgE-Autoreaktivität genutzt werden könnte. Diese Ergebnisse können die Grundlage für neue gezielte Therapien oder diagnostische Tests legen. Insgesamt konnte durch diese Arbeit ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der immunologischen Dysfunktionen in der Pathophysiologie der CSU und anderen Erkrankungen mit autoallergischen Mechanismen geleistet werden.

371 Wörter

EINLEITUNG

Die Urtikaria ist eine Gruppe von Erkrankungen, die durch das Auftreten von Quaddeln und/oder Angioödemem in Begleitung von starkem Juckreiz charakterisiert ist. Die Hauterscheinungen persistieren meist für 30 min, bis hin zu 24 h, während Angioödeme bis zu 72 h lang anhalten können. Man klassifiziert nach der Dauer der Erkrankung in akute oder chronische Urtikaria und nach dem Vorhandensein von externen, symptom-auslösenden Stimuli (z.B. Druck, Kälte) in induzierbare Urtikaria oder spontane Urtikaria [1]. Bei der chronischen spontanen Urtikaria (CSU) treten die Symptome ohne externen Stimulus, d.h. spontan, in einem Zeitraum von mindestens sechs Wochen auf. Bei Symptomen unter sechs Wochen spricht man von einer akuten Urtikaria. Die Erkrankung ist selbst-limitierend, doch persistiert in den meisten Fällen für zwei bis fünf Jahre. Die Prävalenzangaben schwanken in der Literatur stark, es kann jedoch eine 12-Monats-Prävalenz für die CSU von 0,8% angegeben werden [2]. Außerdem haben etwa drei von vier Patienten mit chronischer Urtikaria eine spontane (früher als idiopathisch bezeichnete) Form der Urtikaria. Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer und obwohl die CSU in allen Altersgruppen auftreten kann, sind meist Menschen in der zweiten bis vierten Lebensdekade betroffen [2]. Aufgrund des schwer vorhersagbaren Verlaufs der CSU und den Symptomen auf dem Repräsentationsorgan Haut, die teilweise auch nachts auftreten können und damit zu Schlafstörungen führen, ist die emotionale und psychische Krankheitslast groß [3]. Die Beurteilung, inwieweit die CSU Erkrankung die Lebensqualität der jeweiligen Patienten beeinflusst, erfolgt auf Grundlage der deutschen Version des CU-Q₂₀L (Chronic Urticaria Quality of Life Questionnaire) [4].

Bei der Diagnostik stehen die ausführliche Anamnese und die klinische Untersuchung im Vordergrund und führen meist direkt zur Diagnose. Nur bei Verdacht auf spezifische, zugrundeliegende Ursachen, im Sinne einer induzierbaren Urtikaria oder bei sehr schweren, längeren Krankheitsverläufen, sollten speziellere diagnostische Tests (z.B. Provokationstests, Suche nach chronischen Infekten) durchgeführt werden. Um die Schwere der Erkrankung zu beurteilen wird der „Urticaria Activity Score“ (UAS7; Urtikariaaktivitätstest) erhoben. Die Patienten dokumentieren täglich, für sieben aufeinanderfolgende Tage, die Intensität des Juckreizes (Skala von eins bis drei), sowie die Anzahl der Quaddeln (ebenfalls Skala von eins bis drei) und

summieren alle erhobenen Werte, sodass der maximale Wert des UAS7 bei 42 liegen kann [5].

CSU ist eine Mastzell-vermittelte Erkrankung. Die Symptome werden durch die Aktivierung und anschließende Degranulation von Mastzellen in Haut- und Schleimhaut hervorgerufen [6]. Mastzellen können durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden, dazu zählen u.a. physikalische Reize, Neuropeptide, bakterielle Antigene, Pharmaka und durch den $Fc\epsilon RI$ (hochaffiner IgE-Rezeptor) vermittelte Reaktionen. Die nach Aktivierung freigesetzten Mediatoren sind zum einen vorsynthetisiert und in den Granula der Mastzelle gespeichert, wie beispielweise Histamin, neutrale Proteasen und einige Zytokine. Zum anderen werden Mediatoren nach Aktivierung der Mastzelle neu synthetisiert, beispielsweise Leukotriene oder Prostaglandine. Diese proinflammatorischen Mediatoren stimulieren dann Nervenzellen der Haut, vermitteln Vasodilatation, erhöhen die Gefäßpermeabilität und wirken chemotaktisch auf Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und T-Lymphozyten, was zu der Urtikaria-Symptomatik führt. Als wichtigster Mediator ist hier das Histamin zu nennen, allerdings spielen auch Bradykinin, Plättchen-aktivierender Faktor, sowie cholinerge Mediatoren eine wesentliche Rolle [1, 7]. Die gesamte IgE Serumspiegel von Patienten mit CSU sind in vielen Fällen erhöht, auch Allergien gegen exogene Antigene kommen gehäuft vor [8]. In neueren Studien konnte sogar gezeigt werden, dass allergisches IgE gegen Staphylokokkus Enterotoxin B in CSU Patienten gehäuft vorkommt und mit der Krankheitsaktivität korreliert [9]. Dennoch wurde schon früh festgestellt, dass die CSU keine allergie-induzierte Erkrankung ist, da die Vermeidung von entsprechenden Allergenen nicht zur Remission der CSU Erkrankung führt [8].

Es gibt drei verschiedene autoimmun-vermittelte Mechanismen, die bei der CSU zur Aktivierung von Mastzellen führen: Zum einen durch IgG oder IgM Autoantikörper gegen IgE (anti-IgE-Autoantikörper) oder zum anderen durch Autoantikörper gegen den $Fc\epsilon RI$ (anti- $Fc\epsilon RI$ -Autoantikörper). Das aktivierende Signal besteht im ersten Fall in der Quervernetzung des $Fc\epsilon RI$ durch die Quervernetzung des an den Rezeptoren gebundenen IgE bzw. im zweiten Fall durch die direkte Quervernetzung der $Fc\epsilon RI$ durch die anti- $Fc\epsilon RI$ -Autoantikörper [6]. Als dritte Pathophysiologie kann auf der Oberfläche der Mastzelle an den $Fc\epsilon RI$ gebundenes autoreaktives IgE bei Bindung an das entsprechende Autoantigen auch zu einer Aktivierung durch Quervernetzung der $Fc\epsilon RI$ führen. Dieser Mechanismus wird auch Autoallergie genannt, da er eine

Hypersensibilitätsreaktion (Sofortreaktion) vom Typ I nach „Coombs and Gell“ auslöst, mit dem Unterschied, dass die Reaktion nicht durch Allergene induziert wird, sondern durch Autoantigene.

Autoreaktives IgE gegen die Thyreoperoxidase (IgE-anti-TPO) und gegen doppelsträngige DNA (IgE-anti-dsDNA) konnte in Patienten mit CSU bereits nachgewiesen werden [10]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass an den FcεRI gebundenes IgE auf Mastzellen ohne FcεRI Quervernetzung zum sogenannten „Priming“ der Mastzelle führen kann. Priming steht für die Sensibilisierung der Mastzelle, sodass diese leichter aktiviert wird, sowie für die Förderung von Überleben und Proliferation der Zelle, sowie für die gesteigerte Fähigkeit Mediatoren zu speichern und neu zu synthetisieren [11]. Klinisch kann ein Hinweis auf autoimmun-vermittelten Mechanismen, die zur Entstehung der Urtikaria-Symptomatik führen, über den autologen Serumhauttest (ASST; „Autologous serum skin test“) gewonnen werden, der allerdings nicht zu den Standarduntersuchungen zählt [12]. Hierbei wird dem Patienten zunächst venöses Blut entnommen und dann als Serum intradermal injiziert (meist am Unterarm). Zur positiven Kontrolle des Tests wird an anderer Stelle 0,5–1 µg Histamin (50 µl einer 10–20 µg/ml Histaminlösung) und als Negativkontrolle wird an einer weiteren Stelle isotonische Kochsalzlösung injiziert. Bildet sich nach 30 min als Reaktion auf das eigene Serum eine Quaddel am Unterarm des Patienten, deren Durchmesser mindestens 1,5 mm größer ist als der Durchmesser der negativen Kontrolle, so gilt der ASST als positiv [13] und zugrunde liegende autoimmune Mechanismen können vermutet werden. Der ASST hat eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 80% [12].

Die Therapie der CSU hat gegenwärtig die Linderung der Symptome zum Ziel. Gegeben werden H1-Antihistaminika der zweiten Generation, die bis zum vierfachen der empfohlenen maximalen Tagesdosis hochdosiert werden können. Führt dies innerhalb von vier Wochen nicht zur Symptomkontrolle wird zusätzlich Omalizumab (rekombinanter, monoklonaler Antikörper gegen IgE) verabreicht. Falls auch mit Omalizumab keine zufriedenstellende Symptomkontrolle zu erreichen ist, wird das Immunsuppressivum Cyclosporin A gegeben. Es gibt bis heute keinen kurativen Therapieansatz [1].

Autoreaktives IgE ist nicht nur in der Pathophysiologie der CSU relevant, sondern gerät zunehmend auch in den Fokus der Forschung bei anderen Erkrankungen wie bspw. atopischer Dermatitis (AD), systemischer Lupus erythematodes oder bullösem

Phemphigoid [10]. Erhöhte autoreaktive IgE Spiegel gegen bestimmte, krankheitsspezifische Autoantigene korrelieren mit der Schwere der Erkrankung und tragen wesentlich zur therapeutischen Entscheidungsfindung bei, da die Gabe von Omalizumab bei autoallergischen Erkrankungen zur Symptomkontrolle führen kann [14].

Die Entwicklung von diagnostischen Tests und gezielten oder sogar kurativen Therapien setzt ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der CSU voraus. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des IgE von Patienten mit CSU auf Autoreaktivität, genauso wie die Identifizierung und Quantifizierung der entsprechenden Autoantigene des IgE. Da kreuzreaktives, polyspezifisches IgE häufig lipophile Wechselwirkungen zur Ligandenbindung nutzt [15, 16] und Autoantikörper häufig kreuzreaktiv sind [17, 18], sollte auch die Lipophilie des IgE von CSU Patienten untersucht werden. Durch diese Eigenschaften soll die Differenzierung zwischen CSU-IgE und nicht CSU-IgE ermöglicht und letztlich ein besseres Verständnis der Erkrankung und auch anderer Erkrankungen mit autoreaktivem IgE erzielt werden.

METHODIK

Die detaillierte, technische Beschreibung findet sich in den Nachdrucken der Veröffentlichungen. Im Folgenden findet sich die inhaltliche Zusammenfassung der angewandten Methoden, mit Erläuterung der dadurch zu klärenden Fragestellungen.

Auto-IgEome Analyse

Der erste Schritt zur Adressierung der Fragestellungen ist das Screening auf mögliche Autoantigene des IgE von Patienten mit CSU und von gesunden Kontrollpersonen. Es wurden sieben CSU Patienten ausgewählt, die hinsichtlich ihrer demographischen Charakteristika die gesamte, von uns untersuchte CSU Population gut repräsentieren. Ebenfalls zu diesen Charakteristika passend wurden sieben gesunde Kontrollpersonen ausgewählt. Die Identifizierung der IgE Autoantigene erfolgte mittels Protein Mikroarray-Technik. Auf diesem Mikroarray befanden sich 23232 Felder von denen 2016 mit Proteinen zur Positiv- und Negativkontrolle beschichtet waren. Weitere 18748 Felder waren mit 9374 unterschiedlichen, menschlichen Proteinen beschichtet, welches ca. 45% des menschlichen Proteoms entspricht [19]. Die Proteine sind eukaryotisch mittels Baculovirus in Insektenzellen in voller Länge exprimiert worden

und waren daher voll funktional, hatten eine korrekte Faltung, sowie weitgehend vollständige posttranslationale Modifikationen. Das Serum der Probanden wurde auf jeweils einen Mikroarray aufgetragen und die Bindung des IgE mittels anti-IgE Antikörper (markiert mit einem Fluorophor) detektiert. Mithilfe dieses systematischen Screenings konnten erstmalig viele mögliche Autoantigene des IgE identifiziert und die Anzahl an IgE Autoantigenen der CSU Patienten und der gesunden Kontrollpersonen ermittelt werden. Durch die Fluoreszenzintensität der einzelnen Felder auf dem Mikroarray konnte die Menge an gebundenem IgE pro Feld und damit auch die gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel berechnet werden und in Bezug zu den gesamt IgE Serumspiegeln, ermittelt durch das Zentrallabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin, gesetzt werden (Publikationen 1 und 2). Um mögliche Unterschiede und Überlappungen zwischen den erkannten Autoantigenen des IgE von CSU Patienten und von gesunden Kontrollpersonen aufzudecken wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA; „Principal Component Analyse“) durchgeführt. Zur besseren Visualisierung der Autoantigenmuster wurden die 30 Autoantigene, die im Mittel von allen sieben CSU Patienten am stärksten erkannt wurden und die 30 Autoantigene, die im Mittel von allen sieben gesunden Kontrollpersonen am stärksten erkannt wurden ausgewählt und als Heatmap mit Dendrogramm dargestellt (Publikation 1).

Die Ergebnisse dieses Screenings lieferten zusammengefasst Daten zu: (1) der Anzahl an IgE Autoantigenen, (2) der Menge an autoreaktiven IgE gegen die jeweiligen Autoantigene und dadurch die gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel, (3) der Identifizierung der IgE Autoantigene und der Identifizierung von unterschiedlichen Autoantigen-Gruppen in CSU Patienten und gesunden Kontrollpersonen.

Quantifizierung der IgE-anti-IL-24 Serumspiegel und Funktion

Unter den IgE Autoantigenen konnte IL-24 als wichtigstes und für die CSU spezifisches Autoantigen identifiziert werden. Es wurde als einziges von allen sieben CSU Patienten erkannt und von keinem der Kontrollpersonen, ebenso ist es in der menschlichen Haut für das IgE auf der Oberfläche von Mastzellen zugänglich. Es folgte die genauere Untersuchung des autoreaktiven IgE gegen IL-24 (IgE-anti-IL-24), um herauszufinden inwieweit es das Krankheitsbild der CSU beeinflusst.

Zunächst wurde überprüft, ob das IgE-anti-IL-24, wenn es an den FcεRI auf Mastzellen gebunden ist, über die Bindung an IL-24 zur Degranulation der Mastzelle führen kann,

d.h. es wurde überprüft ob das IgE-anti-IL-24 funktionsfähig ist. Hierfür wurden aus peripheren CD34⁺-Stammzellen abstammende Mastzellen (PSCMCs) gewonnen [20]. Das IgE aus gepooltem Serum von CSU Patienten und aus gepooltem Serum von gesunden Kontrollpersonen wurde mithilfe von magnetischen Beads, an die ein anti-IgE Antikörper gekoppelt wurde, extrahiert. Die PSCMCs wurden mit diesem IgE beladen und mit IL-24, sowie zur Kontrolle mit einem anti-IgE Antikörper, stimuliert. Anschließend wurde die zum gesamten Histamingehalt der Zellen relativierte Histaminausschüttung als Maß der Mastzelldegranulation bestimmt (Publikation 2). Als nächstes erfolgte die Messung der IgE-anti-IL-24 Spiegel in einer größeren Patienten- und Kontrollpopulation. Hierfür entwickelten wir einen neuen Test, der sich die besonderen Fluoreszenzeigenschaften von ionisierten Lanthanoiden (wie Europium) zunutze macht. Charakteristisch für Europium ist die lange Fluoreszenzdauer, die im Gegensatz zu ungewollten Hintergrundsignalen, die nach Nanosekunden abklingen, im Bereich von Mikrosekunden liegt. Die Emission von Europium kann so frei von Hintergrundsignalen gemessen werden. Zuerst wurde das IL-24 mit Europium markiert. Danach wurde das Serum von 1062 CSU Patienten und 482 gesunden Kontrollpersonen auf 384-Well Platten, die zuvor mit einem anti-IgE Antikörper beschichtet wurden, aufgetragen. So wurde das IgE aus dem Serum auf den Platten isoliert und möglicherweise vorhandenes, interferierendes IgG entfernt. Anschließend wurde das mit Europium-markierte IL-24 hinzugefügt. Über die Detektion des gebundenen IL-24 konnten wir indirekt das IgE-anti-IL-24 messen. Das gemessene Signal wurde, mithilfe einer Standardkurve aus IgE-anti-GFP (IgE gegen „green fluorescent protein“), in Units pro ml Serum umgerechnet (Publikation 2).

Messung der IgE-Lipophilie

Für die Messung der Lipophilie des IgE entwickelten wir einen neuen Assay, der den fluoreszierenden Farbstoff Nanoorange nutzt. Die Intensität der Fluoreszenz von Nanoorange wird verstärkt, wenn es an lipophile Bereiche von Proteinen bindet [21]. Das Serum von 232 CSU Patienten und 173 gesunden Kontrollpersonen wurde auf 384-Well Platten, die zuvor mit einem anti-IgE Antikörper beschichtet wurden, aufgetragen. Zu dem gebundenen IgE wurde das Nanoorange hinzugefügt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Um die Vergleichbarkeit der gemessenen Signale auch aus unterschiedlichen Versuchsansätzen zu gewährleisten, normalisierten wir die Signale in Prozent. Der höchste gemessene Wert aus den jeweiligen

Versuchsansätzen wurde auf 100% gesetzt und alle anderen Werte in Relation zu diesem in Prozent umgerechnet. Mithilfe dieser Ergebnisse konnten wir die Lipophilie des IgE von CSU Patienten mit der Lipophilie des IgE von gesunden Kontrollpersonen vergleichen (Publikation 1).

Statistische Auswertungen

Die relativen IgE-Autoantikörper Serumspiegel, in Bezug zu den gesamt IgE Serumspiegeln, spiegeln die physiologische Verteilung der IgE-Autoantikörper besser wieder, als die absoluten IgE Autoantikörper Serumspiegel [22] und wurden daher für die Korrelationsanalysen genutzt. Die statistischen Analysen wurden in „Microsoft Excel“, „Graphpad prism“ und „Clustvis“ [23] durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test getestet, und eine Gaußsche Verteilung diente als Grundlage für die Durchführung von student t Tests. Die Nullhypothese der Zufallsergebnisse wurde abgelehnt, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war. Statistische Unterschiede zwischen Ergebnissen, die nicht normalverteilt waren, wurden mit dem Mann Whitney U-Test berechnet.

ERGEBNISSE

Publikation 1 beschäftigt sich mit den allgemeinen Eigenschaften des autoreaktiven IgE von CSU Patienten, während der Fokus von Publikation 2 auf einem speziellen Autoantigen (IL-24) liegt und den entsprechenden Autoantikörper (IgE-anti-IL-24) genauer untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse beider Publikationen zusammengefasst dargestellt.

IgE von CSU Patienten erkennt mehr und andere Autoantigene als IgE von gesunden Kontrollpersonen

Das erstmalig durchgeführte, systematische Screening auf IgE Autoantigene von CSU Patienten und gesunden Kontrollpersonen lieferte die Grundlage für die Publikationen. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen mit lediglich 34 unterschiedlichen IgE Autoantigenen, konnten insgesamt 226 unterschiedliche Autoantigene des IgE von CSU Patienten identifiziert werden. Die maximale Anzahl an IgE Autoantigenen in einem einzelnen CSU Patienten lag bei 197 Autoantigenen und die minimale Anzahl bei 29 Autoantigenen. Diese große Variation innerhalb der Gruppe der CSU Patienten

steht im Kontrast zu den gesunden Kontrollpersonen, deren IgE maximal 34 Autoantigene und minimal kein einziges Autoantigen erkannte. Zur genaueren Analyse der erkannten Autoantigene wurde eine PCA durchgeführt. Es zeigte sich, dass es keine Überschneidungen der IgE Autoantigene zwischen den CSU Patienten und den gesunden Kontrollpersonen gibt. Beide Gruppen erkennen ein völlig anderes Muster an Autoantigenen, besonders gut sichtbar ist dieses Phänomen in der Visualisierung durch die Heatmap. Die Autoantigene, die vom IgE der gesunden Kontrollpersonen erkannt werden, werden nicht durch das IgE der CSU Patienten erkannt. Genauso werden die Autoantigene, die vom IgE der CSU Patienten erkannt werden, nicht vom IgE der gesunden Kontrollpersonen erkannt. Es gibt außerdem keine große Varianz der IgE Autoantigene innerhalb der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen, im Unterschied hierzu variieren die IgE Autoantigene innerhalb der Gruppe der CSU Patienten stark (Publikation 1).

Fast das gesamte Serum-IgE ist autoreaktives IgE in CSU Patienten

Die Auto-IgEome Analyse mittels Mikroarray lieferte nicht nur Informationen über die IgE Autoantigene, sondern es konnte auch die gesamte Menge an autoreaktiven IgE berechnet werden. Die CSU Patienten und die gesunden Kontrollpersonen haben ähnlich hohe gesamt IgE Serumspiegel, mit jeweils (Mittelwert \pm Standardabweichung) 85 ± 61 IU/ml und 144 ± 115 IU/ml. Die errechneten gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel unterscheiden sich jedoch um das 1000-fache, mit 37 ± 24 IU/ml bei den CSU Patienten und $0,047 \pm 0,039$ IU/ml bei den gesunden Kontrollpersonen. Innerhalb der Gruppe der CSU Patienten variieren diese gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel kaum, alle CSU Patienten haben ähnlich viel autoreaktives IgE. Setzt man die gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel in Relation zu den gesamt IgE Serumspiegeln zeigt sich, dass bei zwei der CSU Patienten das gesamte Serum-IgE autoreaktiv ist. Bei allen getesteten CSU Patienten sind im Durchschnitt $61 \pm 33\%$ des gesamten IgEs autoreaktiv, bei den gesunden Kontrollpersonen lediglich $0,03 \pm 0,008\%$. Es gibt keine Korrelation zwischen den gesamt IgE Serumspiegeln und den gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegeln (Publikation 1).

IgE-anti-IL-24 induziert Mastzelldegranulation

Es konnte gezeigt werden, dass CSU Patienten viel autoreaktives IgE haben und dieses an viele unterschiedliche Autoantigene bindet. IgE-anti-IL-24, als ein Beispiel

für einen solchen IgE Autoantikörper, konnte durch das Mikroarray Screening als der häufigste in CSU Patienten identifiziert werden. IL-24 wird in der Haut exprimiert und hat dadurch hypothetisch die Möglichkeit mit IgE-anti-IL-24 auf der Oberfläche von Mastzellen in der Haut zu reagieren und *in vivo* die Mastzelldegranulation auszulösen. Bei den *in vitro* durchgeführten Experimenten mit PSCMCs konnte gezeigt werden, dass gereinigtes IgE aus dem Serum von CSU Patienten, welches IgE-anti-IL-24 enthält, durch Stimulation mit IL-24 zur Mastzelldegranulation führt. Bei der Stimulation von PSCMCs mit IL-24, die mit gereinigtem IgE aus dem Serum von gesunden Kontrollpersonen, welches wenig IgE-anti-IL-24 enthält, beladen wurden, konnte keine Mastzelldegranulation beobachtet werden. Alleinige Stimulation von unbeladenen PSCMCs mit IL-24 führt nicht zur Mastzelldegranulation (Publikation 2).

IgE-anti-IL-24 als Krankheitsmarker der CSU

Die Ergebnisse des IgE-anti-IL-24 Tests ergaben eine mittlere Serumkonzentration von IgE-anti-IL-24 in 1062 CSU Patienten von $0,52 \pm 0,24$ IU/ml und $0,27 \pm 0,008$ IU/ml in 482 gesunden Kontrollpersonen. Diese Daten ermöglichten die Berechnung der Sensitivität von 80% (95%CI, 76-83%), Spezifität von 80% (95%CI, 75-84%) und des Likelihood-Quotienten von 3,89 bei einem Cut-off (mittels Youden-Index bestimmt) von 0,33 IU/ml. Anhand dieses berechneten Cut-off Wertes sind von den 1062 CSU Patienten 80% und von den 482 gesunden Kontrollpersonen nur 20% positiv für IgE-anti-IL-24. Die IgE-anti-IL-24 Spiegel in Relation zu den gesamt IgE Serumspiegeln in CSU Patienten korrelieren mit der Krankheitsaktivität, die mithilfe des UAS7 ermittelt wurde. Je höher der Quotient IgE-anti-IL-24 (in IU/ml) zu gesamt IgE (in IU/ml), desto höher ist der UAS7-Score in CSU Patienten (Publikation 2).

Erhöhte Lipophilie ist eine Eigenschaft des IgE von CSU Patienten

Der neu entwickelte IgE-Lipophilie Assay ermöglichte den Vergleich der Lipophilie des IgE von 232 CSU Patienten mit der Lipophilie des IgE von 173 gesunden Kontrollpersonen. Der Median (10-90% Perzentile) lag bei den CSU Patienten bei 39% (38-40%) und bei den gesunden Kontrollpersonen bei 28% (26-29%). Damit ist das IgE der CSU Patienten im Mittel 1,4-fach lipophiler als das IgE der gesunden Kontrollpersonen. Die mit diesen Daten erstellte ROC-Kurve („Receiver-Operating-Characteristics“) zeigte eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 72%, bei

einem Cut-off von 31% (mittels Youden-Index) für erhöhte Lipophilie des IgE als Marker für CSU (Publikation 1).

Korrelation zwischen IgE-Lipophilie und IgE-Autoreaktivität

Der prozentuale Anteil von autoreaktiven IgE zum gesamt IgE korreliert mit dem Quotienten IgE-anti-IL-24 (IU/ml) zu gesamt IgE (IU/ml), genauso wie mit den absoluten IgE-anti-IL-24 Serumspiegeln in CSU Patienten und gesunden Kontrollpersonen. IgE-anti-IL-24 kann also als Surrogatmarker für autoreaktives IgE genutzt werden. Um eine mögliche Verbindung zwischen den beiden Eigenschaften Autoreaktivität und Lipophilie des IgE von CSU Patienten aufzudecken, nutzten wir den Quotienten IgE-anti-IL-24 (IU/ml) zu gesamt IgE (IU/ml) als Surrogatmarker für die gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel. Der Surrogatmarker korrelierte hochgradig signifikant mit dem Quotienten IgE-Lipophilie (%) zu gesamt IgE (IU/ml) bei CSU Patienten. Damit zeigt sich eine lineare Korrelation zwischen der Lipophilie und der Autoreaktivität von IgE aus Patienten mit CSU (Publikation 1).

DISKUSSION

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von autoreaktivem IgE in der Pathophysiologie der CSU, um ein besseres Verständnis der Erkrankung und insbesondere der immunologischen Dysfunktionen zu erlangen. So wird die Grundlage für neue diagnostische Tests und gezielte Therapien geschaffen. Das IgE von CSU Patienten erkennt wesentlich mehr und völlig andere Autoantigene als das IgE gesunder Kontrollpersonen, zudem ist fast das gesamte IgE der CSU Patienten autoreaktiv. IgE-anti-IL-24 konnte als häufigster und funktionsfähiger Autoantikörper in CSU Patienten identifiziert werden, dessen Serumspiegel korreliert mit der Krankheitsaktivität und kann als Krankheitsmarker für die CSU verwendet werden. Ebenso kann er als Surrogatmarker für das gesamt-autoreaktive IgE stehen. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Lipophilie eine Eigenschaft des IgE von CSU Patienten darstellt und diese erhöhte Lipophilie verbunden ist mit der Autoreaktivität desselben IgE.

Der große Unterschied zwischen den IgE Autoantigenen von CSU Patienten und gesunden Kontrollpersonen, insbesondere das Fehlen von Überschneidungen, ist ein nahezu einzigartiges Phänomen im Vergleich zu anderen, autoreaktiven

Antikörpertypen [24-26]. Antikörper vom Typ IgE, beispielsweise reaktiv gegen Allergene, sind häufig polyreaktiv und erkennen ganze Gruppen von Allergenen. Klinisch zeigt sich diese Polyreaktivität, bzw. Kreuzreaktivität des IgE als sogenannte Kreuzallergie [27]. Da auch Autoantikörper meist polyreaktiv sind [17, 18, 28] und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine große Anzahl an Autoantigenen vom IgE erkannt werden, liegt die Hypothese nahe, dass das autoreaktive IgE der CSU Patienten auch polyreaktiv ist. Polyreaktives, autoreaktives IgE liefert auch eine Erklärung für die fehlenden Überschneidungen zwischen dem IgE Autoantigenmuster der CSU Patienten und der gesunden Kontrollpersonen. Es ist wahrscheinlicher, dass wenige, polyreaktive IgE-Autoantikörper vorliegen, die in CSU Patienten verändert sind und daher die Autoantigene des IgE der gesunden Kontrollpersonen nicht mehr erkennen, als die Erklärung, dass viele monospezifische IgE-Autoantikörper in CSU Patienten plötzlich verschwinden und durch neue, andere monospezifische IgE-Autoantikörper ersetzt werden.

Autoreaktives IgE wird in immer mehr verschiedenen Erkrankungen gefunden und korreliert mit der jeweiligen Krankheitsaktivität. Auch bei Patienten mit CSU konnten bereits vereinzelt IgE-Autoantikörper, beispielsweise gegen TPO oder doppelsträngige DNA identifiziert und in Verbindung mit der Krankheitsaktivität gebracht werden [10]. Die hohen Serumspiegel an autoreaktiven IgE, die den größten Teil des gesamt IgE in CSU Patienten ausmachen, unterstreichen den großen Stellenwert der Autoallergie am Krankheitsbild der CSU. Trotz der hohen gesamt-autoreaktiven IgE Serumspiegel deutet die geringe Varianz zwischen der absoluten Menge an autoreaktiven IgE bei den CSU Patienten, unabhängig von den gesamt IgE Serumspiegeln, darauf hin, dass es eine Obergrenze an autoreaktiven IgE gibt. Einerseits unterliegt die Produktion von IgE durch B-Zellen einem inhibitorischen Feedbackmechanismus durch die Bindung an den niedrig-affinen IgE-Rezeptor CD23 [29]. Andererseits werden Autoantikörper häufig als natürliche Antikörper von B1 B-Zellen produziert, deren Homöostase könnte ebenfalls zu einer Obergrenze an autoreaktiven IgE Serumspiegeln führen [30].

Die klinische Relevanz der IgE-Autoantikörper konnte insbesondere durch die Identifizierung von IgE-anti-IL-24 gezeigt werden. Auf der Oberfläche von Mastzellen gebundenes IgE-anti-IL-24 kann durch Stimulation mit IL-24 *in vitro* zur Mastzelldegranulation und Histaminausschüttung führen. Die gemessenen IgE-anti-IL-24 Serumspiegel sind mit bis zu 1% des gesamt IgE Serumspiegels hoch genug um Krankheitssymptome auslösen zu können, da selbst niedrigere Konzentrationen, an

bspw. IgE-Antikörpern gegen β -Laktam-Antibiotika, zu klinischen Symptomen führen können [22]. Zudem deutet die Korrelation der IgE-anti-IL-24 Serumspiegel mit der Krankheitsaktivität stark auf eine Beteiligung von autoreaktiven IgE bzw. IgE-anti-IL-24 an der Pathophysiologie der CSU hin und kann damit eine Bestätigung für die Wirksamkeit des anti-IgE Antikörpers Omalizumab sein. Die Bestimmung von IgE-anti-IL-24 Serumspiegeln kann sogar als diagnostisches Kriterium bzw. Krankheitsmarker der CSU herangezogen werden.

Erhöhte Lipophilie konnte als Eigenschaft des IgE von CSU Patienten nachgewiesen werden. Lipophiles IgE wurde bereits in Patienten, die allergisch gegen lipophile Medikamente sind, sowie in Patienten mit AD gefunden. Das IgE von Patienten mit AD ist auch in hohem Maße autoreaktiv, es konnten bereits über 140 Autoantigene des IgE von Patienten mit AD identifiziert werden [10]. Bei Patienten, die allergisch gegen lipophile Medikamente sind, wurde die IgE-Lipophilie durch diese ebenfalls lipophilen Antigene erklärt, die Antigen-Antikörper-Bindung wird hier durch einen höheren Anteil an Van-der-Waals-Wechselwirkungen gebildet, welche dann insgesamt zu betont lipophilen Wechselwirkungen führen [31]. Diese lipophilen Wechselwirkungen können auch zwischen lipophilem IgE und anderen lipophilen Antigenen entstehen und zu deren Bindung beitragen, welches letztlich in Polyreaktivität des Antikörpers resultiert [32]. Die erhöhte Lipophilie des IgE von CSU Patienten unterstützt damit die Hypothese des autoreaktiven IgE, das auch polyreaktiv ist, in CSU.

Durch die Korrelation von IgE-anti-IL-24 als Surrogatmarker für autoreaktives IgE mit der IgE-Lipophilie, konnte eine Verbindung zwischen diesen beiden Eigenschaften des IgE von CSU Patienten hergestellt werden. Autoreaktivität von anderen Antikörpern wurde in früheren Studien mit lipophilen CDR3 („complementary determining region 3“) Antigenbindungsstellen in Verbindung gebracht, die ursächlich für die Autoreaktivität sein können [33]. Außerdem ergab die Analyse des IgE von einem Patienten mit AD, dass die variablen Domänen dieses IgE aus nur bestimmten, wenigen unterschiedlichen V-Segmenten besteht und die CDR3 Antigenbindungsstelle der schweren Kette maßgeblich für die Polyreaktivität dieses IgE-Antikörpers ist [18]. Dadurch entsteht die Hypothese, dass autoreaktives IgE die Benutzung von lipophilen V-Segmenten bevorzugt und diese zur Autoreaktivität des IgE beitragen. Ein ähnliches Phänomen wurde für antinukleäre Antikörper als Beispiel eines Autoantikörpers beobachtet. Obwohl sie aus fast jeder variablen Domäne der

schweren Kette bestehen können, verwenden die meisten von ihnen eine von nur vier unterschiedlichen, bevorzugten variablen Domänenfamilien der schweren Kette [34]. Zusammengefasst konnte durch diese Arbeit ein besseres Verständnis der Erkrankung CSU erreicht werden. Autoreaktives IgE spielt in der Pathophysiologie der Erkrankung eine wesentliche Rolle und erklärt dadurch die Wirksamkeit der aktuellen, symptomatischen Therapieprinzipien. IgE-anti-IL-24 als erstmalig identifizierter Krankheitsmarker der CSU kann als diagnostisches Kriterium aus dem Serum bestimmt werden. Außerdem gelang es mithilfe der Eigenschaft Lipophilie das IgE von CSU Patienten von dem IgE von gesunden Kontrollpersonen zu unterscheiden. Durch die Korrelation der Eigenschaften Lipophilie und Autoreaktivität des IgE von CSU Patienten konnten nicht nur neue Fragestellungen hinsichtlich der Herkunft und der Ursache des autoreaktiven IgE aufgestellt werden, sondern diese kann auch die Basis für einen neuen, einfachen Assay sein, der gesamt Autoreaktivität von IgE im Serum messen kann. Da autoreaktives IgE nicht nur in der Erkrankung CSU eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch in einer ständig wachsenden Anzahl anderer Erkrankungen als relevant erkannt wird [10], ist ein einfacher Assay zur Bestimmung der Autoreaktivität von IgE aus dem Serum für zukünftige Studien besonders interessant. Ebenso ist die genauere Erforschung der Ursache von Autoallergien für deren Therapie essentiell, für die diese Arbeit eine Grundlage bietet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Zuberbier, T., W. Aberer, R. Asero, A.H. Abdul Latiff, D. Baker, B. Ballmer-Weber, J.A. Bernstein, C. Bindslev-Jensen, Z. Brzoza, R. Buense Bedrikow, G.W. Canonica, M.K. Church, T. Craig, I.V. Danilycheva, C. Dressler, L.F. Ensina, A. Gimenez-Arnau, K. Godse, M. Goncalo, C. Grattan, J. Hebert, M. Hide, A. Kaplan, A. Kapp, C.H. Katelaris, E. Kocaturk, K. Kulthanan, D. Larenas-Linnemann, T.A. Leslie, M. Magerl, P. Mathelier-Fusade, R.Y. Meshkova, M. Metz, A. Nast, E. Nettis, H. Oude-Elberink, S. Rosumeck, S.S. Saini, M. Sanchez-Borges, P. Schmid-Grendelmeier, P. Staubach, G. Sussman, E. Toubi, G.A. Vena, C. Vestergaard, B. Wedi, R.N. Werner, Z. Zhao, and M. Maurer, The EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO Guideline for the Definition, Classification, Diagnosis and Management of Urticaria. The 2017 Revision and Update. *Allergy*, 2018. 73(7): p. 1393-1414.
2. Maurer, M., K. Weller, C. Bindslev-Jensen, A. Gimenez-Arnau, P.J. Bousquet, J. Bousquet, G.W. Canonica, M.K. Church, K.V. Godse, C.E. Grattan, M.W. Greaves, M. Hide, D. Kalogeromitros, A.P. Kaplan, S.S. Saini, X.J. Zhu, and T. Zuberbier, Unmet clinical needs in chronic spontaneous urticaria. A GA(2)LEN task force report. *Allergy*, 2011. 66(3): p. 317-30.
3. Maurer, M., M. Abuzakouk, F. Berard, W. Canonica, H. Oude Elberink, A. Gimenez-Arnau, C. Grattan, K. Hollis, A. Knulst, J.P. Lacour, C. Lynde, A. Marsland, D. McBride, A. Nakonechna, J. Ortiz de Frutos, C. Proctor, G. Sussman, C. Sweeney, H. Tian, K. Weller, D. Wolin, and M.M. Balp, The burden of chronic spontaneous urticaria is substantial: Real-world evidence from ASSURE-CSU. *Allergy*, 2017. 72(12): p. 2005-2016.
4. Weller, K., M.K. Church, D. Kalogeromitros, K. Krause, M. Magerl, M. Metz, D. Pisarevskaja, F. Siebenhaar, and M. Maurer, Chronic spontaneous urticaria: how to assess quality of life in patients receiving treatment. *Arch Dermatol*, 2011. 147(10): p. 1221-3.
5. Beck, L.A., J.A. Bernstein, and M. Maurer, A Review of International Recommendations for the Diagnosis and Management of Chronic Urticaria. *Acta Derm Venereol*, 2017. 97(2): p. 149-158.
6. Church, M.K., P. Kolkhir, M. Metz, and M. Maurer, The role and relevance of mast cells in urticaria. *Immunol Rev*, 2018. 282(1): p. 232-247.

7. Metz, M. and M. Maurer, Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol*, 2007. 28(5): p. 234-41.
8. Augey, F., N. Gunera-Saad, B. Bensaid, A. Nosbaum, F. Berard, and J.F. Nicolas, Chronic spontaneous urticaria is not an allergic disease. *Eur J Dermatol*, 2011. 21(3): p. 349-53.
9. Altrichter, S., T. Hawro, M. Liedtke, G. Holtappels, C. Bachert, P.S. Skov, and M. Maurer, In chronic spontaneous urticaria, IgE against staphylococcal enterotoxins is common and functional. *Allergy*, 2018. 73(7): p. 1497-1504.
10. Maurer, M., S. Altrichter, O. Schmetzer, J. Scheffel, M.K. Church, and M. Metz, Immunoglobulin E-Mediated Autoimmunity. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 689.
11. Panaszek, B., R. Pawlowicz, J. Grzegorzolka, and A. Obojski, Autoreactive IgE in Chronic Spontaneous/Idiopathic Urticaria and Basophil/Mastocyte Priming Phenomenon, as a Feature of Autoimmune Nature of the Syndrome. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2017. 65(2): p. 137-143.
12. Sabroe, R.A., C.E. Grattan, D.M. Francis, R.M. Barr, A. Kobza Black, and M.W. Greaves, The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol*, 1999. 140(3): p. 446-52.
13. Kumar, Y.H., S. Bhaskar, and K. Shankar, Comparative Study of Positive Versus Negative Autologous Serum Skin Test in Chronic Spontaneous Urticaria and its Treatment Outcome. *N Am J Med Sci*, 2016. 8(1): p. 25-30.
14. van Beek, N., N. Luttmann, F. Huebner, A. Recke, I. Karl, F.S. Schulze, D. Zillikens, and E. Schmidt, Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA Dermatol*, 2017. 153(1): p. 30-38.
15. Dall'antonia, F., T. Pavkov-Keller, K. Zangger, and W. Keller, Structure of allergens and structure based epitope predictions. *Methods*, 2014. 66(1): p. 3-21.
16. Droupadi, P.R., J.M. Varga, and D.S. Linthicum, Mechanism of allergenic cross-reactions--IV. Evidence for participation of aromatic residues in the ligand binding site of two multi-specific IgE monoclonal antibodies. *Mol Immunol*, 1994. 31(7): p. 537-48.
17. Crouzier, R., T. Martin, and J.L. Pasquali, Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors. *J Immunol*, 1995. 154(9): p. 4526-35.

18. Edwards, M.R., W. Brouwer, C.H. Choi, J. Ruhno, R.L. Ward, and A.M. Collins, Analysis of IgE antibodies from a patient with atopic dermatitis: biased V gene usage and evidence for polyreactive IgE heavy chain complementarity-determining region 3. *J Immunol*, 2002. 168(12): p. 6305-13.
19. Huang, Y. and H. Zhu, Protein Array-based Approaches for Biomarker Discovery in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017. 15(2): p. 73-81.
20. Schmetzer, O., P. Valentin, A. Smorodchenko, R. Domenis, G. Gri, F. Siebenhaar, M. Metz, and M. Maurer, A novel method to generate and culture human mast cells: Peripheral CD34+ stem cell-derived mast cells (PSCMCs). *J Immunol Methods*, 2014. 413: p. 62-8.
21. Grossart, H.P., G.F. Steward, J. Martinez, and F. Azam, A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66(8): p. 3632-6.
22. Vultaggio, A., G. Virgili, F. Gaeta, A. Romano, E. Maggi, and A. Matucci, High serum beta-lactams specific/total IgE ratio is associated with immediate reactions to beta-lactams antibiotics. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0121857.
23. Metsalu, T. and J. Vilo, ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(W1): p. W566-70.
24. Haddon, D.J., V.K. Diep, J.V. Price, C. Limb, P.J. Utz, and I. Balboni, Autoantigen microarrays reveal autoantibodies associated with proliferative nephritis and active disease in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2015. 17: p. 162.
25. Rinaldi, S., K.M. Brennan, G. Kalna, C. Walgaard, P. van Doorn, B.C. Jacobs, R.K. Yu, J.E. Mansson, C.S. Goodyear, and H.J. Willison, Antibodies to heteromeric glycolipid complexes in Guillain-Barre syndrome. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e82337.
26. Galban-Horcajo, F., L. Vlam, E. Delmont, S.K. Halstead, L. van den Berg, W.L. van der Pol, and H.J. Willison, The Diagnostic Utility of Determining Anti-GM1: GalC Complex Antibodies in Multifocal Motor Neuropathy: A Validation Study. *J Neuromuscul Dis*, 2015. 2(2): p. 157-165.
27. Simpson, A., N. Lazic, D.C. Belgrave, P. Johnson, C. Bishop, C. Mills, and A. Custovic, Patterns of IgE responses to multiple allergen components and clinical symptoms at age 11 years. *J Allergy Clin Immunol*, 2015. 136(5): p. 1224-31.

28. Collins, A.M., W.A. Sewell, and M.R. Edwards, Immunoglobulin gene rearrangement, repertoire diversity, and the allergic response. *Pharmacol Ther*, 2003. 100(2): p. 157-70.
29. Fellmann, M., P. Buschor, S. Rothlisberger, F. Zellweger, and M. Vogel, High affinity targeting of CD23 inhibits IgE synthesis in human B cells. *Immun Inflamm Dis*, 2015. 3(4): p. 339-49.
30. Durand, C.A., K. Hartvigsen, L. Fogelstrand, S. Kim, S. Iritani, B. Vanhaesebroeck, J.L. Witztum, K.D. Puri, and M.R. Gold, Phosphoinositide 3-kinase p110 delta regulates natural antibody production, marginal zone and B-1 B cell function, and autoantibody responses. *J Immunol*, 2009. 183(9): p. 5673-84.
31. Gueant, J.L., E. Mata, C. Masson, P. Gerard, D.A. Moneret-Vautrin, C. Mouton-Faivre, and M.C. Laxenaire, Non-specific cross-reactivity of hydrophobic serum IgE to hydrophobic drugs. *Mol Immunol*, 1995. 32(4): p. 259-66.
32. Apostolovic, D., S. Sanchez-Vidaurre, K. Waden, M. Curin, J. Grundstrom, G. Gafvelin, T. Cirkovic Velickovic, H. Gronlund, W.R. Thomas, R. Valenta, C. Hamsten, and M. van Hage, The cat lipocalin Fel d 7 and its cross-reactivity with the dog lipocalin Can f 1. *Allergy*, 2016. 71(10): p. 1490-5.
33. Lipsanen, V., B. Walter, M. Emara, K. Siminovitch, J. Lam, and A. Kaushik, Restricted CDR3 length of the heavy chain is characteristic of six randomly isolated disease-associated VH J558+ IgM autoantibodies in lupus prone motheaten mice. *Int Immunol*, 1997. 9(5): p. 655-64.
34. Chen, L., S. Chang, and C. Mohan, Molecular signatures of antinuclear antibodies-contributions of heavy chain CDR residues. *Mol Immunol*, 2002. 39(5-6): p. 333-47.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Elisa Lakin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung des IgE in Patienten mit Chronischer Spontaner Urtikaria hinsichtlich der Autoreaktivität und Lipophilie“ bzw. „Characterization of IgE from patients with chronic spontaneous urticaria with regard to autoreactivity and lipophilicity“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Elisa Lakin hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics, 2019.

Anteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Analyse und Visualisierung der Auto-IgEome Screening Ergebnisse (hieraus entstanden die Abbildungen 1 und 2); Etablierung und Optimierung des IgE-Lipophilie Assays; Auswahl der Studienpopulation; Messung der Proben (IgE-anti-IL-24 Assay und IgE-Lipophilie Assay); statistische Auswertung und Korrelation (hieraus entstanden die Abbildungen 3 und 4); Schreiben des Manuskripts

Publikation 2:

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. 2018

Anteil: 15 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Optimierungen des IgE-anti-IL-24 ELISA; Messung der Proben (hieraus entstanden die Abbildungen 4 und 5); Korrigieren des Manuskripts

Elisa Lakin
Doktorandin

Prof. Dr. med. Marcus Maurer
betreuender Hochschullehrer

AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST

Publikation 1:

„On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria“ (Fachzeitschrift: Theranostics) befindet sich auf **Platz 8 von 133** im Bereich “Medicine, Research and Experimental”.

Publikation 2:

„IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria“ (Fachzeitschrift: Journal of Allergy and Clinical Immunology) befindet sich auf **Platz 1 von 18** im Bereich “Allergy”.

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions:
 SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“MEDICINE, RESEARCH and EXPERIMENTAL”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 133 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE MEDICINE	75,461	32.621	0.171980
2	Science Translational Medicine	26,691	16.710	0.126450
3	Annual Review of Medicine	6,111	14.970	0.010320
4	JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION	107,818	13.251	0.165270
5	TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE	9,213	11.021	0.019720
6	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	62,537	10.790	0.078310
7	EMBO Molecular Medicine	6,402	10.293	0.026160
8	Theranostics	5,761	8.537	0.015710
9	MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE	5,157	7.344	0.009700
10	MOLECULAR THERAPY	16,013	7.008	0.029180
11	Nanomedicine- Nanotechnology Biology and Medicine	9,338	6.500	0.015670
12	Wiley Interdisciplinary Reviews- Nanomedicine and Nanobiotechnology	2,088	6.350	0.004260
13	EBioMedicine	3,378	6.183	0.015290
14	Molecular Therapy-Nucleic Acids	2,180	5.660	0.008200
15	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE	3,538	5.584	0.007100
16	ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation	1,261	5.232	0.001990
17	CLINICAL SCIENCE	10,321	5.220	0.013630
18	mAbs	3,767	5.165	0.011220
19	Stem Cell Research & Therapy	4,578	4.963	0.012630
20	JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM	7,120	4.938	0.011400
21	Translational Research	3,416	4.880	0.009000
22	XENOTRANSPLANTATION	1,479	4.717	0.002550
...

Copyright © 2018 Thomson Reuters

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions:
SCIE,SSCI

Selected Categories: '**ALLERGY**' Selected Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 18 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	49,229	13.258	0.083800
2	Journal of Allergy and Clinical Immunology-In Practice	2,802	6.966	0.009670
3	CLINICAL REVIEWS IN ALLERGY & IMMUNOLOGY	2,741	6.442	0.005880
4	ALLERGY	16,476	6.048	0.025790
5	World Allergy Organization Journal	1,352	5.676	0.003800
6	CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY	10,784	5.158	0.014370
7	CONTACT DERMATITIS	5,484	4.275	0.003800
8	PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY	4,341	4.137	0.006970
9	ALLERGOLOGY INTERNTIONAL	1,696	4.036	0.003460
10	Allergy Asthma & Immunology Research	1,385	3.809	0.003430
11	IMMUNOLOGY AND ALLERGY CLINICS OF NORTH AMERICA	1,569	3.694	0.002730
12	Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology	2,921	3.544	0.006090
13	Clinical and Translational Allergy	766	3.539	0.002740
14	JOURNAL OF INVESTIGATIONAL ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	2,090	3.457	0.002390
15	CURRENT ALLERGY AND ASTHMA REPORTS	2,290	3.449	0.005260
16	ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY	7,379	3.263	0.009700
17	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY	4,874	2.437	0.005470
18	ALLERGY AND ASTHMA PROCEEDINGS	1,898	2.213	0.003390

Copyright © 2018 Clarivate Analytics

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 1: <https://doi.org/10.7150/thno.29902>

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

doi: 10.7150/thno.29902

Impact factor: **8,537** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

Publikation 2: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.035>

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.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2018 Sept;142(3):876-882.

DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.035

Impact factor: **13,258** (2017 Journal Citation Reports)

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O.

On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria.

Theranostics 2019; 9(3):829-836.

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 2018 Sept;142(3):876-882.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst Dr. Oliver Schmetzer, der mit seiner hartnäckigen Motivation und pausenlosen Ansprechbarkeit einfach der perfekte Betreuer für mich war. Ich habe sehr viel von ihm gelernt.

Ferner möchte ich mich bei Professor Martin Church bedanken, weil er durch seine Erfahrung und Gelassenheit die idealen Bedingungen für die Anfertigung meiner Publikation geschaffen hat.

Ein großer Dank geht auch an meinen Doktorvater Professor Marcus Maurer, für die stets freundliche Hilfe und die Ermöglichung dieser Dissertation.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie für die finanzielle Unterstützung und bei meinen Freunden für das geduldige Zuhören.