

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Autoallergie –
Ein neuer Mechanismus der Entstehung der Nesselsucht.
Rolle von Schilddrüsenautoantikörpern in der Pathogenese
der chronischen Urtikaria.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt
von Herman Hidajat
aus Wolfsburg.

Mainz, 2004

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 14. Dezember 2004

Meinen Eltern und meiner Oma gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	8
1.1	Einführung	8
1.2	Mastzelle–Effektorzelle der Auslösung urtikarieller Reaktionen	10
1.2.1	Definition	10
1.2.2	Herkunft, Proliferation und Differenzierung	12
1.2.3	Heterogenität und Verteilung	13
1.2.4	Aktivierung	13
1.2.5	Der FcεRI-Rezeptor	16
1.2.6	Produkte der Mastzelle	16
1.3	Definition der Urtikaria – Nesselsucht	19
1.3.1	Einteilung und Formen der Urtikaria	22
1.3.2	Bisherige Therapie bei Urtikaria-Patienten	27
1.4	Derzeitiger Stand der Forschung	29
2.	ZIEL DER UNTERSUCHUNG	31
3.	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Zellen	32
3.1.1	Sp2-Myelomhybridzelllinie	32
3.1.2	RBL-Rattenbasophile	32
3.2	Geräte und Instrumente	34
3.3	Chemikalien und Antikörper	36
3.4	IgE-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	37
3.5	TPO-Biotinylierung	39
3.6	Direkter ELISA	40
3.7	Indirekter (capture) site directed IgE-anti-TPO-ELISA	41
3.8	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	47
3.9	Betahexosaminidase Assay	49
3.10	Entnahme von Venenvollblut bei CU-Patienten und Kontrollpersonen	51
3.11	Statistische Analysen	52

5.	ERGEBNISSE	53
5.1	Darstellung der Häufigkeit auffälliger Schilddrüsenbefunde bei einem CU-Patientenkollektiv.	53
5.2	Entwicklung eines spezifischen site-directed IgE-anti-TPO-ELISA zum Nachweis „autoallergischer“ anti-TPO-Antikörper.	54
5.3	Ein Viertel aller untersuchten CU-Patienten zeigten erhöhte IgE-anti-TPO-AK im Serum.	60
5.4	Die Wahrscheinlichkeit hoher IgE-anti-TPO Werte im Serum ist größer, wenn zugleich erhöhte IgG-anti-TPO Werte vorliegen.	62
5.5	Mastzellen werden durch IgE-anti-TPO-AK aktiviert.	64
5.6	Die Verminderung von SD-Autoantikörpern im Serum in Folge einer Thyreodektomie kann zu einer Verminderung urtikarieller Beschwerden führen.	66
6.	DISKUSSION	68
7.	ZUSAMMENFASSUNG	76
8.	LITERATURVERZEICHNIS	77
9.	ANHANG	87
9.1	Abbildungsverzeichnis	87
9.2	Tabellenverzeichnis	88
10.	DANKSAGUNG	89
11.	LEBENS LAUF	90

Abkürzungsverzeichnis:

AAK	= Autoantikörper
IgE-anti-TPO	= Immunglobulin E-anti-Thyreoidperoxidase
AK	= Antikörper
ARAM	= antigen recognition activation motifs
CIU	= chronisch-idiopathische Urtikaria
CMless	= Zellmedium
CTMC	= connective tissue mast cells
CU	= chronische Urtikaria
D	= Dalton
ELISA	= Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	= Durchflußzytometrie
FcεRI	= hochaffiner IgE-Rezeptor
H1, H2, H3	= Histaminrezeptor 1, - 2, - 3
h-TPO	= humane Thyreoperoxidase
Ig (A, D, E, G, M)	= Immunglobulin (A, D, E, G, M)
IL-2	= Interleukin 2
IU	= International Unit(s)
kD	= kilo Dalton
LTC ₄ , -D ₄ , -E ₄	= Leukotrien C ₄ , -D ₄ , -E ₄
LYN	= Lck/yes-related novel tyrosine kinase
MMC	= mucosal mast cells
MZ	= Mastzelle
OD	= Optische Dichte
OP	= Operation
PBS	= Phosphate buffered saline
PGD ₄	= Prostaglandin D ₄
RBL	= rat basophilic leukaemia
RT	= Raumtemperatur
SCF	= Stem cell factor
SD	= Schilddrüse
SDS	= Sodium Dodecyl Sulphate (Natriumdodecylsulfat)
SRC	= Thyrosinkinase Rous Sarkom

SYK	= spleen thyrosine kinase
T3	= Trijodthyronin (Schilddrüsenhormon)
T4	= Thyroxin (Schilddrüsenhormon)
TG	= Thyreoglobulin
TPO	= Thyreoperoxidase
U/min.	= Umdrehungen pro Minute
Vol.	= Volumen

1. Einleitung

1.1 Einführung

„Wenn man sich als Dermatologe niederlässt und die ersten drei Patienten haben eine chronische Urtikaria und es handelt sich um die Pfarrersköchin, den Lehrer und die Frau des Bürgermeisters, dann soll man die Praxis sofort wieder schließen und möglichst weit entfernt von diesem Ort neu eröffnen“ (Schröpl, 1986).

Diese nette kleine Geschichte wird von F. Schröpl in dem Geleitwort für sein Buch „Die chronische Urtikaria“ erzählt. Damit veranschaulicht er eindrucksvoll und einprägsam das Krankheitsbild der chronischen Urtikaria (CU) als „*crux medicorum*“ (Schröpl, 1986).

Auch heute noch ist es trotz intensiver diagnostischer Anstrengungen oft nicht möglich, bei CU-Patienten die Ursache der chronischen Nesselsucht festzustellen. Diese für Arzt und Patienten sehr unbefriedigende Situation macht es notwendig, nach weiteren Erkenntnissen in der Ätiopathogenese der chronischen Urtikaria zu suchen. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, weil der Leidensdruck von Patienten mit chronischer idiopathischer Urtikaria (CIU) allgemein unterschätzt wird, wohl auch vor dem Hintergrund, dass es sich dabei weder um eine lebensbedrohliche noch, in den meisten Fällen, um eine lebenslange Erkrankung handelt. So konnte eine Arbeitsgruppe um Greaves zeigen, dass die Erkrankung das tägliche Leben und soziale Gewohnheiten von CIU-Patienten erheblich beeinträchtigt (O'Donnell *et al*, 1997). 73% der befragten Patienten gaben an, Einladungen zu gesellschaftlichen Ereignissen nicht wahr zu nehmen oder aus dem Weg zu gehen. Ebenso viele beklagten negative Auswirkungen auf ihr Sexualleben, 70% änderten ihre Bekleidungsgewohnheiten und 54% änderten ihre Ernährungsgewohnheiten. Etwa 50% mieden körperliche Anstrengung und viele fühlten sich minderwertig und unattraktiv. Schlaf und Erholung waren bei Urtikaria-Patienten stark vermindert, was nicht selten Aggression und Frustration zur Folge hatte (O'Donnell *et al*, 1997).

Dabei wirkt sich die Erkrankung nicht nur für die einzelnen betroffenen Patienten äußerst einschränkend aus, sondern auch auf das Umfeld der Patienten. Dies könnte zunehmend zu einem Problem der Gesellschaft und der Gesundheitspolitik

werden. Einschätzungen zur Folge liegt die Prävalenz der Urtikaria in der Gesamtpopulation zwischen 1-5% (Paul und Greilich, 1991; Schafer und Ring, 1993). Urtikariaerkrankungen zählen heutzutage zu den 20 häufigsten dermatologischen Erkrankungen (Schafer und Ring, 1993). Immer mehr Neuerkrankungen oder kürzere symptomfreie Intervalle bei immer häufiger auftretenden chronischen Verlaufsfällen führen vermehrt zu Arbeitsausfällen bzw. Schulausfällen, bishin zur Berufsunfähigkeit. Auch die Behandlung der Patienten mit Antihistaminika führt gelegentlich zur Leistungsminderung, etwa durch Nebenwirkungen wie z.B. Müdigkeit. Dies könnte die arbeitspolitische Situation zwischen Arbeitgeber und –nehmer kritisch verschärfen.

Es gibt viele Gründe, die Behandlung von CU-Patienten zu verbessern, idealerweise, in dem Nesselsuchtpatienten vermehrt heilenden Therapieverfahren zugeführt werden. Derzeit wird der größte Teil aller CU-Patienten rein symptomatisch behandelt und bei weniger als 20% aller CU-Patienten wird die Ursache der Nesselsucht therapiert und so die Krankheit zur Ausheilung gebracht. Um die Nesselsucht kurativ behandeln zu können, ist es notwendig, bisher unbekannte Ursachen dieser Erkrankung zu identifizieren. Die vorliegende Arbeit zeigt einen solchen bisher unbekannten Mechanismus der Entstehung der chronischen Urtikaria auf. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das Auftreten urtikarieller Symptome bei einem Teil der CU-Patienten auf einer autoallergischen Aktivierung von Hautmastzellen beruhen könnte.

1.2 Mastzelle – Effektorzelle der Auslösung urtikarieller Reaktionen

1863 konnte von Recklinghausen eine bis dahin unbekannte Zelle an ungefärbten Schnitten von Froschmesenterium nachweisen (Recklinghausen, 1863). Diese Zelle differenzierte Paul Ehrlich 1877 von Plasmazellen durch die Metachromasie mit basischen Farbstoffen (z.B. Toluidinblau, Anilinblau). Paul Ehrlich nannte diese Zelle Mastzelle (Ehrlich-Mastzelle), weil er glaubte, dass die Granula als Nahrungsstoffe durch Phagozytose aufgenommen und gespeichert werden und die Zelle somit „gemästet“ wird (Ehrlich, 1879; Kühnel, 1995).

Auch heute noch dient die metachromatische Anfärbbarkeit der zytoplasmatischen Granula zur lichtmikroskopischen Identifizierung von Mastzellen.

1.2.1 Definition

Mastzellen (MZ) sind ubiquitär vorkommende und gewebsständige Zellen, die in allen bisher untersuchten Säugetierspezies nachgewiesen worden sind (Galli, 1990). Es sind große (10-20µm), langlebige, runde bis ovale, mononukleäre Zellen, deren Zytoplasma mit charakteristischen, elektronendichten, metachromatischen und sekretorischen Granula gefüllt sind. Sie können sowohl in ihrer Form als auch in der Struktur ihrer Matrix heteromorph erscheinen. Der Zellkern der Mastzellen ist rund und liegt in der Regel zentral (Kühnel, 1995).

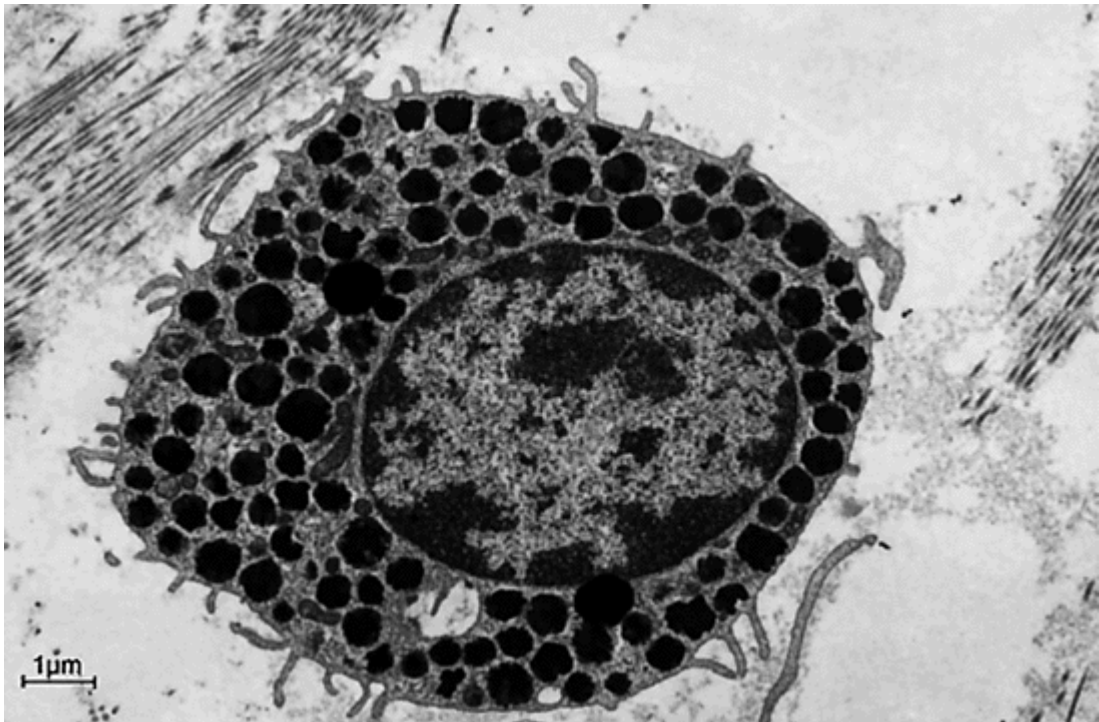


Abbildung 1: Elektronenmikroskopisches Bild einer Mastzelle.

Man erkennt deutlich die zytoplasmatischen Granula (schwarz) und den großen zentral gelegenen runden Zellkern. Quelle: Sobotta Histologie, Hrsg. Welsch, 5. Auflage, Urban und Schwarzenberg 1997.

Eines der charakteristischen Merkmale von MZ ist die Produktion von potenten (Entzündungs-) Mediatoren, wie z.B. Histamin, Serotonin, Heparin. Dabei unterscheiden sich manche MZ-Charakteristika von Organ zu Organ (Organspezifität der MZ) oder von Spezies zu Spezies (Serotonin z.B. kann nur in MZ von Nagetieren, nicht jedoch in humanen MZ nachgewiesen werden) (Galli, 2000).

Weitere charakteristische Merkmale, die die MZ definieren und somit von anderen Zellen abgrenzen, sind ihre Morphologie, die Lokalisation, der spezifische Rezeptorenbestand und die Metachromasie der Granula (Tab. 1) (Grabbe *et al*, 1994; Kühnel, 1995; Church und Levi-Schaffer, 1997).

Tabelle 1	
<u>Charakteristische Merkmale der Mastzelle im Überblick.</u>	
Morphologie	Größe (10-20µm) Mononukleär Oft zentraler, runder bis ovaler Zellkern
Lokalisation	Ubiquitär im Bindegewebe Besonders in der Umgebung kleiner Gefäße Gewebsständig
Charakteristische Rezeptoren	FcεRI-Rezeptor (hochaffiner IgE-Rezeptor) SCF-Rezeptor (Rezeptor für stem cell factor [SCF])
Granula	Metachromatisch Elektronendicht Im gesamten Zytoplasma Von einer Membran umhüllt
Mediatoren	Potente Entzündungsmediatoren, (z.B. Histamin, Heparin, Serotonin, Tryptase, Chymase)

1.2.2 Herkunft, Proliferation und Differenzierung

Mastzellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Diese Vorläuferzellen, denen wesentliche MZ-Merkmale (z.B. typischer Rezeptorenbestand, Granulainhalt) noch fehlen, gelangen nach Zirkulation im Blut durch Migration in das Bindegewebe. Dort proliferieren sie und differenzieren sich zu morphologisch identifizierbaren, reifen Mastzellen (Kitamura *et al*, 1993; Holgate, 1996).

Einer der frühesten Marker für MZ stellt der Tyrosinkinase-Rezeptor Kit (CD 117) dar, der auch von reifen MZ exprimiert wird und eine bedeutsame Rolle in der Proliferation und Differenzierung spielt (Galli *et al*, 1994).

Galli und Kitamura konnten zeigen, dass eine fehlende oder fehlerhafte Expression von Kit oder dessen Liganden SCF (stem cell factor) die Entwicklung

von MZ beeinträchtigen. In Mäusen, bei denen Kit fehlerhaft funktioniert oder fehlt kommt es zu einer mangelnden Entwicklung, zu einer Reduktion oder zum völligen Fehlen differenzierter MZ in zahlreichen Geweben und Organen (Galli und Kitamura, 1987; Tsai *et al*, 1991).

1.2.3 Heterogenität und Verteilung

Mastzellen besitzen viele charakteristische Eigenschaften, durch die sie definiert werden und die allen MZ gemein sind (Tab.1). Trotz vieler Gemeinsamkeiten besteht zwischen Mastzellen unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Lokalisation eine starke Heterogenität im Bezug auf ihre morphologischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften (Kitamura, 1989; Galli, 1990; Malaviya und Abraham, 1998).

Bei der Maus werden die MZ nach ihrer Lokalisation und unterschiedlichen Färbereigenschaften in „connective tissue mast cells“ (CTMC, Gewebs-MZ) und „mucosal mast cells“ (MMC) unterteilt. Humane MZ werden nach ihrem Proteasegehalt in zwei große Gruppen eingeteilt: Erstens MZ, die nur Tryptase exprimieren (MZ_T) und zweitens MZ die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren (MZ_{TC}). MZ der Haut sind zu fast 100% MZ_{TC} (Galli, 2000; Schwartz, 1991; Holgate, 1996).

Inzwischen ist die Existenz unterschiedlicher Mastzellsubpopulationen unumstritten. Dennoch sind die Geheimnisse um die Mastzellen im Bezug auf die Heterogenität und deren Unterteilung sowie deren physiologische und pathologische Bedeutung noch nicht vollständig gelöst und sind weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.2.4 Aktivierung

Mastzellen können durch viele unterschiedliche Substanzen stimuliert und zur Degranulation gebracht, sowie zur Neusynthese von Mediatoren angeregt werden. Als Degranulation bezeichnet man den Vorgang, bei dem die MZ nach Aktivierung/Stimulierung den Inhalt an sekretorischer Granula, sprich die

Mediatoren (z.B. Histamin), durch Exozytose an die Umgebung abgibt (Holgate, 1996). Ein Aktivierungsmechanismus der MZ ist die Quervernetzung der auf der MZ-Oberfläche befindlichen Fc ϵ RI-Rezeptoren durch IgE und Antigen. Dies führt bei Typ I allergischen Reaktionen zur Degranulation der MZ. MZ sind *in vivo* praktisch immer mit IgE-Molekülen beladen. Erst nach der Quervernetzung der rezeptorgebundenen IgE-Moleküle, dem so genannten „crosslinking“, kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren und zur Aktivierung einer Signaltransduktionskette, was letztlich die Mediatorausschüttung zur Folge hat. Die Intensität der Degranulation erhöht sich dabei entsprechend der Anzahl an IgE-bindenden-Fc ϵ -Rezeptoren auf der Zellmembran (Lawson *et al*, 1978; DeLisi und Siraganian, 1979; Holgate, 1996) oder entsprechend der Konzentration an MZ-stimulierenden Substanzen (Kownatzki, 1982). Werden Antigene gebunden, die nicht mindestens zwei oder mehr IgE-Moleküle verbinden kommt es nicht zum „crosslinking“, und die Degranulation bleibt aus (Holgate, 1996).

Eine Fc ϵ RI-Rezeptor-Quervernetzung und die damit verbundene Aktivierung der Zellen kann gleichfalls durch anti-IgE Antikörper anstelle des Allergens hervorgerufen werden (Williams *et al*, 1972; Fiebiger *et al*, 1996) oder, unabhängig von IgE-Molekülen oder Antigenen, durch Antikörper gegen den Fc ϵ -Rezeptor selbst (anti-Fc ϵ RI-Immunglobulin) (Fiebiger *et al*, 1996).

Eine neue Theorie, die Gegenstand dieser vorliegenden Arbeit und bislang unbewiesen ist, beschreibt den Mechanismus der „**Autoallergie**“ (Abb. 2). Spezifische IgE-Auto-Antikörper, gebunden an Fc ϵ RI-Rezeptoren, werden durch ein (endogenes) Auto-Antigen quervernetzt, und dadurch wird eine Degranulation ausgelöst.

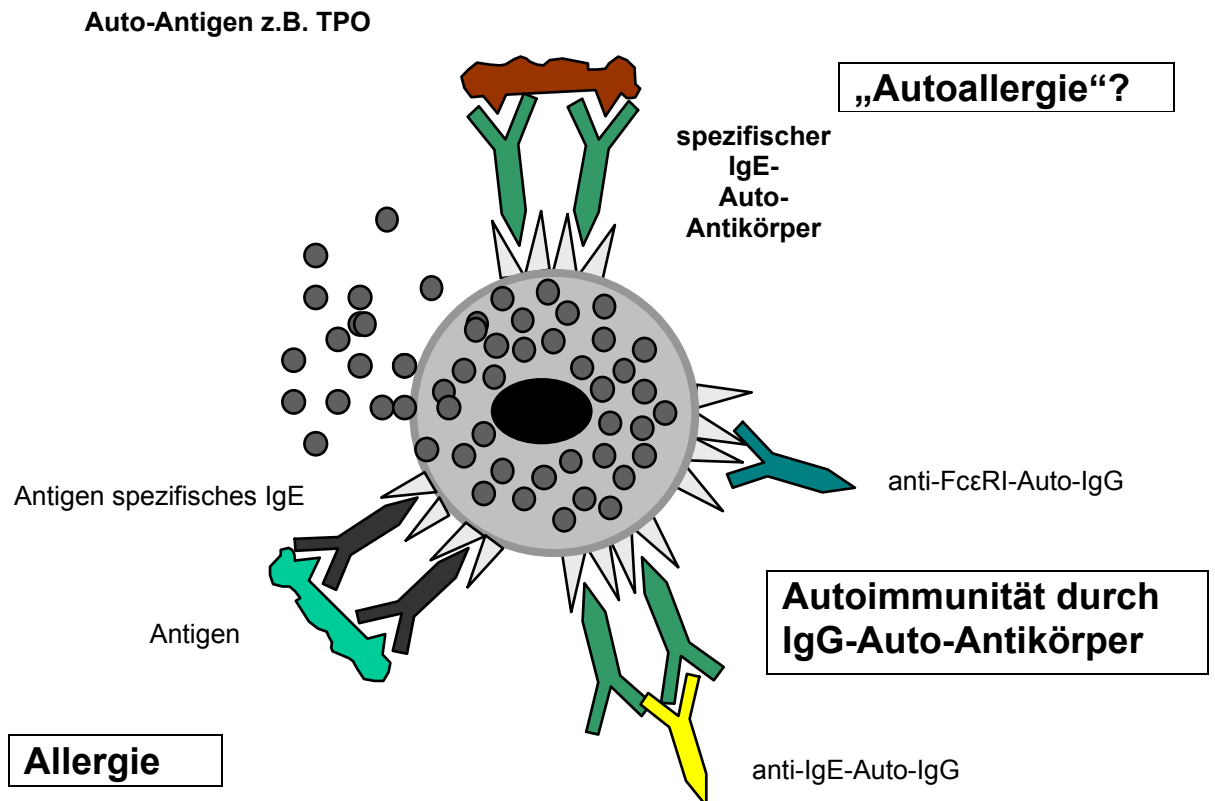


Abbildung 2: Übersicht der antikörpervermittelten Aktivierungsmechanismen der Mastzelle.

Die drei möglichen Prinzipien der Aktivierung von Mastzellen durch AK umfassen: erstens die klassische Allergie mit IgE-AK plus spezifischem Antigen, zweitens die Autoimmunität durch IgG-Auto-AK, bei der zwei Mechanismen in Frage kommen. Zum einen die Quervernetzung der Rezeptoren durch anti-FcεRI-Auto-IgG oder zum anderen durch anti-IgE-Auto IgG-AK. Drittes, bislang unbewiesenes und in dieser Arbeit zu klärendes Prinzip, ist das der „**Autoallergie**“. Dabei werden spezifische IgE-Auto-AK mit ihrem Fc-Teil an die FcεRI-Rezeptoren gebunden und durch ein spezifisches (endogenes) Auto-Antigen, z.B. TPO, quervernetzt.

Neben dem klassischen immunologischen Weg über die Quervernetzung der IgE-Moleküle gibt es noch eine Reihe sog. „nicht immunologischer“ bzw. IgE-unabhängiger Stimuli für Mastzellen (Murphy *et al*, 1987; Paus *et al*, 1994; Williams *et al*, 1995).

Im Gegensatz zu den dargestellten antikörpervermittelten Aktivierungsmechanismen, haben diese Stimuli in der Regel bei dermalen Mastzellen eine Kalzium-unabhängige, wenige Sekunden andauernde Degranulation mit einer unterschiedlichen Zusammensetzung an Mediatorstoffen zur Folge (Dvorak, 1993).

IgE-unabhängige Stimuli für humane Mastzellen der Haut sind, um nur einige zu nennen, Neuropeptide wie Substanz P, vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und Somatostatin, Faktoren des Komplementsystems wie Anaphylatoxin C5a und C3a, sowie die basische Substanz Compound 48/80 und Morphinderivate (Johnson *et al*, 1975; Benyon *et al*, 1987; He *et al*, 1990; Wasserman, 1990; Foreman, 1993; Paus *et al*, 1995).

1.2.5 Der Fc ϵ RI-Rezeptor

Fc-Rezeptoren sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Proteine, die spezifisch für das Fc-Fragment eines Antikörpers bestimmten Isotyps sind.

Der Fc ϵ RI-Rezeptor auf basophilen Granulozyten und Mastzellen besteht aus vier Untereinheiten (α , β , γ , γ). Die α -Untereinheit reguliert die IgE-Bindung, da sie die Bindungsstelle für den Fc-Teil des IgE-Moleküls enthält (Shimizu *et al*, 1988; Hakimi *et al*, 1990; Blank *et al*, 1991; Beavil *et al*, 1993).

Die anderen Ketten sind für den Transport des Rezeptors an die Oberfläche und für die Signalübermittlung nach IgE-Bindung und Dimerisierung des Rezeptors erforderlich (Jouvin *et al*, 1995; Holgate, 1996).

1.2.6 Produkte der Mastzelle

Mastzellen sind im übertragenen Sinne mit kleinen Fabriken vergleichbar, denn sie enthalten und produzieren nach entsprechender Stimulation eine große Vielfalt und Menge biologisch aktiver Mediatoren, welche zu einer fast unüberschaubaren Zahl unterschiedlicher Effekte führen.

Die Funktion und die Stärke der Auswirkung von MZ-Mediatoren hängen stark von dem Organ/ Gewebe (Lokalisation), dem MZ-Subtyp und der Spezies ab. Die Intensität der Degranulation und damit die Menge an freigesetzten Mediatoren korreliert in direktem Zusammenhang mit der Anzahl an MZ pro Fläche, der Rezeptorendichte auf der Membran und der Art der Aktivierung.

Ein Teil der Mediatoren wird vorgefertigt in den zytoplasmatischen Granula gespeichert und andere wiederum werden als Folge der MZ-Aktivierung neu synthetisiert. Man unterscheidet drei Klassen von Mediatoren (Schwartz, 1991):

1. präformierte, lösliche Mediatoren in den Mastzellgranula

(z.B. Histamin, Heparin, Chondroitinsulfat, Chymase, Tryptase)

2. de novo synthetisierte von Lipiden abgeleitete Mediatoren

(z.B. PGD₂, LTC₄, LTD₄, PAF)

3. Mastzell-Zytokine

(z.B. IL-1 - IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF α , TGF β , IFN γ)

zu 1. Präformierte Mediatoren:

Histamin

Dem Histamin kommt bei allen Urtikariaformen eine überaus große Bedeutung zu. Die typische urtikarielle Hautreaktion entspricht derjenigen Hauterscheinung, die durch intrakutane Histamininjektion provozierbar ist, nämlich Rötung durch Vasodilatation, Ödem durch erhöhte Kapillarpermeabilität und ein durch den Axonreflex ausgelöstes Erythem (Ring, 1992).

Histamin ist ein äußerst potenter vasoaktiver Mediator, der in erster Linie für die Quaddelentstehung verantwortlich gemacht wird. Als vorgefertigte Mediatorsubstanz ist Histamin in basophilen Granulozyten, vor allem aber in Mastzellen, enthalten, die den Hauptspeicherplatz des im Körper vorhandenen Histamins darstellen (Armenaka und Rosenstreich, 1992).

Histamin entfaltet seine biologische Wirksamkeit über vier verschiedene Histaminrezeptoren (H1-H4-Rezeptoren), die sich in Lokalisation und Funktion unterscheiden. H1-Rezeptoren findet man z.B. in der Haut, wo sie nach Aktivierung zu Gefäßerweiterung, erhöhter Vasopermeabilität und Juckreiz führen (Armenaka und Rosenstreich, 1992). Zudem wirkt die H1-Rezeptoraktivierung bei einer Entzündungsreaktion proinflammatorisch durch vermehrte Prostaglandinproduktion und durch Chemotaxis von Eosinophilen und Neutrophilen. Die Histaminwirkung auf H2-Rezeptoren bewirkt gegenteiliges,

indem die Eosinophilen-/Neutrophilenchemotaxis gehemmt wird, T-Suppressorzellen stimuliert werden und die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung aus Mastzellen und Basophilen verringert wird (Armenaka und Rosenstreich, 1992).

H3-Rezeptoren sind vorwiegend im Gehirn lokalisiert (Armenaka und Rosenstreich, 1992), H4-Rezeptoren in peripheren Geweben (Knochenmark, Milz, Lunge, Leber, Leukozyten) und vermutlich nicht an der Auslösung urtikarieller Hautreaktionen beteiligt (Coge *et al*, 2001; Liu *et al*, 2001; Oda und Matsumoto, 2001).

zu 2. De novo synthetisierte Mediatoren

Prostaglandine und Leukotriene

Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Leukotrien D₄ (LTD₄) gehören zu den wichtigsten Lipidmediatoren, die die Mastzellen nach ihrer Degranulation synthetisieren und freisetzen. PGD₂ und LTD₄ sind beide Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels, mit dem Unterschied, dass Prostaglandine über den Cyclooxygenase-Weg und Leukotriene über den 5-Lipoxygenase-Weg entstehen. PGD₂ wirkt vasodilatatorisch und erhöht die Gefäßpermeabilität, wobei die Wirkung langsamer auftritt als bei Histamin und insgesamt auch länger anhält (Armenaka und Rosenstreich, 1992).

LTC₄ wird in LTD₄ und LTE₄ umgewandelt. Ebenso wie Histamin und Prostaglandin D₄ erhöhen auch LTC₄, LTD₄ und LTE₄ die Gefäßpermeabilität. Bei einer intrakutan-Testung dieser Leukotriene kommt es zu einer urtikariellen Sofortreaktion, die für mehrere Stunden anhält (Armenaka und Rosenstreich, 1992).

zu 3. Mastzell-Zytokine

Zytokine sind verantwortlich für die Induktion und Koordination einer Vielzahl lokaler Prozesse bei der allergischen Entzündungsreaktion. Zu den wichtigen Zytokin-produzierenden Zellen gehören auch die Mastzellen, die z.B. IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , RANTES und andere synthetisieren (Church und Levi-Schaffer, 1997).

IL-4 und IL-13 spielen eine Rolle bei der Aktivierung der IgE-Produktion in B-Lymphozyten. IL-3, IL-5, IL-6, IL-8 und RANTES sind an der Aktivierung und Chemotaxis von Granulozyten beteiligt. IL-5, GM-CSF und TNF- α steigern die Bildung endothelialer und epithelialer Adhäsionsmoleküle, und aktivieren gleichfalls die Mediatorausschüttung aus Leukozyten.

Die Synthese und Freisetzung oben genannter Zytokine durch Mastzellen erfolgt ebenfalls nach Aktivierung des Fc ϵ RI-Rezeptors oder nach einer Stimulation durch Fc ϵ RI-unabhängige MZ-Sekretagoga (Cieslewicz und Dahinden, 1996; Holgate, 1996; Kuna und Kaplan, 1996; Church und Levi-Schaffer, 1997; Gordon *et al*, 1997; Marone *et al*, 1997).

1.3 Definition der Urtikaria – Nesselsucht

Der Begriff Urtikaria leitet sich von der lateinischen Bezeichnung für Brennnessel „*urtica dioica*“ ab. Die Hautsymptome von Urtikaria-Patienten entsprechen eindrucksvoll der Hautreaktion, die nach Kontakt mit dieser Pflanze entsteht. Die deutsche Bezeichnung lautet dementsprechend „Nesselsucht“ bzw. „Nesselfieber“ (Braun-Falco *et al*, 1994)

Die typische urtikarielle Hautreaktion wird charakterisiert durch folgende drei Merkmale (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996):

- Quaddel mit Reflexerythem
- Pruritus (Juckreiz)
- Flüchtigkeit/ Dynamik.

Das histologische Äquivalent der Quaddel (lat.: *urtica*) ist ein umschriebenes Ödem in der oberen Dermis, welches durch Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung der subepidermalen Blutgefäße, mit nachfolgendem Plasmaaustritt, entsteht (Schafer und Ring, 1993; Braun-Falco *et al*, 1994). Klinisch erscheint die Quaddel als erhabene, scharf begrenzte, derbe Effloreszenz, die innerhalb kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten) auf dem Boden einer Rötung entsteht. Quaddeln können stark in Form und Größe variieren und konfluieren bisweilen zu beetartigen, bizarren Formen. Die weißlich-gelbe Eigenfarbe der Quaddel entsteht, aufgrund des Austritts von Plasmabestandteilen und der dadurch bedingten lokalen Kompression von Hautgefäßen. Oft wird die Quaddel von einem so genannten Reflexerythem umgeben, das durch die Freisetzung von Substanz P und anderen Neuropeptiden aus sensorischen Nerven verursacht wird (sog. Axonreflex) (Henz *et al*, 1996).

Der Pruritus (Juckreiz) geht in der Regel mit der Quaddel einher, wobei Intensität und Qualität individuell sehr stark variieren können (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996).

Die Dynamik der urtikariellen Hautveränderungen ist nach der raschen Entstehung durch eine ebenso rasche Flüchtigkeit gekennzeichnet. Bei rascher Resorption können Quaddeln bereits nach 20 Minuten wieder verschwunden sein. Im Allgemeinen bestehen sie aber bis zu mehreren Stunden. Bestehen Einzeleffloreszenzen länger als 1-2 Tage, kann das Vorliegen einer Urtikaria ausgeschlossen werden und es ist z.B. an eine Urtikariavaskulitis zu denken (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996).



Abbildung 3: Hautveränderungen bei chronischer Urtikaria.

Mehrere Quaddeln erstrecken sich über die unteren Extremitäten und konfluieren in manchen Bereichen.

Spielen sich diese oben beschriebenen Hauterscheinungen in der Subkutis ab, spricht man vom sog. Quinke Ödem (Angioödem). Angioödeme sind häufig im Gesicht zu beobachten, wo die Dermis dünn und das subkutane Bindegewebe locker angeordnet ist (Schafer und Ring, 1993; Braun-Falco *et al*, 1994). Angioödeme können isoliert oder gleichzeitig mit einer Urtikaria auftreten. Diese plötzlich auftretenden Ödeme der tieferen Kutis, der Subkutis und Submukosa persistieren bis zu 72 Stunden. Der Juckreiz ist beim Angioödem eher selten zu beobachten. Vital bedrohliche Situationen, wie z.B. Atemnot, können von Angioödem verursacht werden, wenn sich diese im Mund-, Rachen- oder Halsbereich manifestieren (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996).

1.3.1 Einteilung und Formen der Urtikaria

Die Urtikaria ist keine homogene klinische Entität, sondern eher als Reaktionsmuster der Haut auf bestimmte äußere und innere Reize zu verstehen. Üblicherweise werden Unterformen der Urtikaria nach deren zeitlichen Verläufen und/ oder nach den zugrunde liegenden Auslösern oder Ursachen definiert (Ring, 1992; Henz *et al*, 1996). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Einteilung der verschiedenen Urtikariaformen.

Bei der Einteilung der Urtikaria nach dem zeitlichen Verlauf unterscheidet man die akute von der chronischen Urtikaria. Bei einer Verlaufsdauer von bis zu 6 Wochen spricht man *per definitionem* von einer akuten Urtikaria. Besteht die Urtikaria 6 Wochen und länger, handelt es sich um eine chronische Form (Champion, 1974).

Bei der chronischen Urtikaria kann es des weiteren klinisch zu einer chronisch-kontinuierlichen-, mit täglich auftretenden Quaddeln, oder zu einer chronisch-rezidivierenden Erscheinungsform, mit Quaddeln in Abständen von mehreren Tagen und dazwischen liegenden erscheinungsfreien Intervallen, kommen (Lehach und Rosenstreich, 1992; Schafer und Ring, 1993; Henz *et al*, 1996).

Die akute Urtikaria ist die häufigste Form und heilt meist spontan ab. Bei weniger als 1% der Fälle mit akuter Urtikaria geht die Krankheit nach Literaturangaben in eine chronische Form über (Greaves, 1995; Henz *et al*, 1996).

Zwei weitere Kriterien, die eine urtikarielle Hauterscheinung charakterisieren können, sind: ein lokal begrenztes oder ein generalisiertes Auftreten, und eine spontan auftretende oder eine induzierbare Form der Hauterscheinung. So sind beispielsweise alle physikalischen Urtikariaformen induzierbar und lokal begrenzt, d.h. auf den Ort der Einwirkung beschränkt, ebenso wie die Kontakturtikaria. Die Autoreaktive- sowie die Infekt- und die Intoleranzurtikaria treten dagegen spontan und generalisiert auf.

Tabelle 2: Klassifikation der Urtikariaerkrankungen.

Gruppe	Urtikariaerkrankung
Akute Urtikaria	Akute Urtikaria
Chronische Urtikaria	Autoreaktive Urtikaria Infekturtikaria Intoleranzurtikaria Urtikaria anderer Ursache Idiopathische Urtikaria
Physikalische Urtikaria	Kälteurtikaria Wärmeurtikaria Druckurtikaria Röntgenurtikaria Lichturtikaria Urticaria factitia
Andere Urtikariaerkrankungen	Cholinergische Urtikaria Aquagene Urtikaria Kontakturtikaria Adrenerge Urtikaria Anstrengungsinduzierte Urtikaria

Die Autoreaktive Urtikaria (ArU) ist eine Form der chronischen Urtikaria (CU), deren Hautreaktionen durch Mastzell-aktivierende Serumbestandteile verursacht wird. Um die Diagnose ArU zu stellen, wird der Autologe Serumtest (ASST= autologous serum skin test) durchgeführt, der sich gegenüber anderen Hauttestverfahren, wie z.B. der Pricktestung, durchgesetzt hat und einfach durchzuführen ist. Etwa 1/3 bis 2/3 aller CU-Patienten weisen ein positives ASST-Ergebnis auf, was vermuten lässt, dass die urtikariellen Hautreaktionen dieser Pat. auf einer ArU beruhen. Bei dem ASST wird aus Venenvollblut des Pat. Serum gewonnen und intrakutan injiziert (50µl, volarer Unterarm). Zur Kontrolle werden eine Histaminlösung und eine Kochsalzlösung mitgetestet. Als positiv wird die Hauttestung angesehen, wenn nach 30 min. der Durchmesser der Serum-induzierten Quaddel den Durchmesser der evtl. entstandenen Kochsalzquaddel (negativ-Kontrolle) um 1,5mm oder mehr übertrifft. Ein positives ASST-Ergebnis weist einen autoaktivierenden Effekt des Serums auf MZ nach und beweist, dass mindestens ein zirkulierendes MZ-Sekretagog vorliegt. Um eine Autoimmun-

Urtikaria (AiU) als Unterform der ArU diagnostizieren zu können, bedarf es, neben einem positiven ASST, weiterführenden Untersuchungen. Denn es ist nicht ausgeschlossen, dass eine positive Hautreaktion im ASST auf eine Auto-Antikörper(AAK)-unabhängige MZ-Aktivierung zurückzuführen ist. Um den Verdacht der AiU zu erhärten, müssen AAK (z.B. anti-FcεRI-AAK, anti-IgE-AAK) nachgewiesen und in einem zweiten Schritt die funktionelle MZ-Zellaktivierung getestet werden. Der AAK-Nachweis erfolgt mittels Western Blot und/oder ELISA (Enzym linked sorbent Assay), bei denen die Höhe der AAK-Serumtiter bestimmt werden können. Der Nachweis von AAK lässt nicht zwingend auf eine AiU schließen, denn nicht alle anti-FcεRI-AAK und anti-IgE-AAK aktivieren MZ. Deshalb erfolgt die Testung der Zellaktivierung mittels Freisetzungsversuchen an Zelllinien und der Messung an freigesetzten MZ-Mediatoren (z.B. Histamin, Hexosaminidase, Leukotriene). Beide Verfahren sind aufwendig und sowohl kosten- als auch zeitintensiv, jedoch unabdingbar zur Diagnosesicherung einer AiU.

Patienten mit AiU zeigen im Vergleich zu Patienten mit anderen CU-Unterformen einen allgemein schwereren klinischen Verlauf (mehr Quaddeln, mehr Juckreiz, mehr systemische Symptome). Laborchemisch weisen AiU Patienten weniger Basophile, weniger zelluläres Histamin und verringertes Gesamt-IgE auf (Sabroe *et al*, 1998; Sabroe *et al*, 1999)

Allgemein sind die ArU und die AiU durch schwere Krankheitsverläufe gekennzeichnet, was die Notwendigkeit unterstreicht, einfach durchzuführende, kostengünstige und standardisierte Nachweismethoden zu etablieren, um betroffenen Patienten möglichst bald heilende Therapieverfahren zukommen lassen zu können.

Nahrungsmittel-(NM) Intoleranzen und NM-Allergien kommen als Ursache für eine Urtikaria ebenfalls in Frage. Die NM-Allergie und andere Allergien spielen als Ursache für eine chronische Urtikaria so gut wie keine Rolle, denn allergisch verursachte urtikarielle Hautreaktionen verschwinden ebenso schnell wie sie gekommen sind, d.h. nach wenigen Minuten bis wenigen Stunden und meist ist den Betroffenen der kausale Zusammenhang zwischen einem verursachenden Allergen und den Hautreaktionen schnell klar, so dass in Zukunft auf mögliche auslösende Stoffe automatisch verzichtet wird. Die NM-Intoleranz dagegen stellt

eine der häufigsten Ursachen der chronischen Urtikaria dar, insbesondere der chronisch-kontinuierlich verlaufenden Form. Die Angaben zur Relevanz und Häufigkeit von NM-Intoleranzen als Ursache der CU schwanken in der Literatur erheblich (1% bis >50%), was z.T. auf unterschiedliche Patientenpopulationen und unterschiedliche Nachweisverfahren zurückzuführen ist. Im Unterschied zu NM-Allergien erfolgt die Aktivierung kutaner MZ bei der NM-Intoleranz IgE-unabhängig, d.h. ohne vorherige Sensibilisierung. Als ursächliche Stoffe kommen unter anderem künstliche Additiva, in Obst und Gemüse vorkommende Aromastoffe und Medikamente in Frage. Die Identifikation der Ursache der CU ist aus mehreren Gründen schwierig. Häufig liegen Intoleranzen gegen mehrere NM-Komponenten vor und gelegentlich führt nur die gemeinsame Aufnahme mehrerer Stoffe zu urtikariellen Reaktionen. In einigen Fällen treten die urtikariellen Symptome zeitlich oft erheblich verzögert auf, so dass der Bezug zum auslösenden Stoff leicht verloren geht bzw. nicht hergestellt werden kann. Intoleranzreaktionen verlaufen dosisabhängig, so dass in Abhängigkeit von der verzehrten Menge ein Stoff Beschwerden verursachen kann oder urtikarielle Reaktionen ausbleiben, was zur Verwirrung von Patient und Arzt beiträgt. Bei einer Intoleranz gegen NM-Bestandteile bzw. -zusätze treten urtikarielle Reaktionen durch alle NM auf, die diesen Zusatz enthalten und daher unabhängig von dem eigentlichen NM. Schließlich ist bisher weitgehend unklar auf welchem Weg und durch welche Signale es bei der NM-Intoleranz zu einer Aktivierung kutaner MZ kommt. Geeignete Ansätze zur kurativen Heilung von NM-Allergien und NM-Intoleranzen gibt es mit Ausnahme einer entsprechenden Eliminationsdiät bisher nicht.

Die physikalische Urtikaria kann nach Literaturangaben 10-50% aller chronisch verlaufenden Urtikariaformen ausmachen (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996). Eine genetische Prädisposition oder assoziierte Krankheiten können ursächlich bzw. auslösend sein. Im Allgemeinen betrifft die Krankheit meist junge Erwachsene. Sie entsteht oft ohne erkennbaren Grund, bleibt einige Jahre bestehen und klingt dann wieder ab, kann aber auch jahrzehntelang persistieren (Henz *et al*, 1996).

Die physikalische Urtikaria ist in der Regel induzierbar und auf den Ort der Einwirkung lokalisiert. Sie wird eingeteilt nach der Natur der Auslöser, d.h. der

mechanischen, thermischen und elektromagnetischen Reize.

Die mechanisch ausgelösten Urtikariaformen umfassen die Urticaria factitia, die Druckurtikaria und das vibratorische Angioödem (Henz *et al*, 1996):

Patienten mit Urticaria factitia leiden unter einem intermittierenden, generalisierten Pruritus und chronisch rezidivierender Quaddelbildung, hauptsächlich an Stellen mit Einwirkung von Scherkräften auf die Haut. Urticaria factitia ist die häufigste Form der physikalischen Urtikaria. Sie kommt in allen Altersgruppen vor und zeigt einen Gipfel bei jungen Erwachsenen (Henz *et al*, 1996).

Patienten mit Druckurtikaria entwickeln insbesondere an Körperregionen die hohem Druck ausgesetzt sind (z.B. Handfläche, Fußsohle, Gesäß) eine typische tief gelegene Schwellung, die zum Teil mit starken Schmerzen verbunden ist. Häufig ist die Druckurtikaria mit grippeartigen Allgemeinsymptomen verbunden (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996).

Zu den durch thermische Reize ausgelösten Formen gehören die Kälte- und Wärmeurtikaria. Bei der Kälteurtikaria kommt es an kälteexponierten Hautarealen zur Ausbildung von juckenden Erythemen und Quaddeln oder zu Angioödem (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996).

Die Wärmeurtikaria ist äußerst selten und wird durch direkte externe Wärme- und Hitzeeinwirkung auf der Haut ausgelöst. Wahrscheinlich handelt es sich um eine psychovegetative Störung mit gesteigerter Sensibilität histaminfreisetzender Mastzellen gegenüber Wärme (Braun-Falco *et al*, 1994; Henz *et al*, 1996).

Elektromagnetische Wellen können die lichtinduzierte Urtikaria und die seltene Röntgenurtikaria auslösen (Henz *et al*, 1996).

Die urtikarielle Hautreaktion bei der Kontakturtikaria ist die Folge eines exogenen Kontaktes mit einem urtikariogenen Stoff, z.B. mit Brennnesseln. Die Effloreszenz ist meist auf den Ort der Einwirkung beschränkt (Braun-Falco *et al*, 1994).

Man unterscheidet zwischen allergischer und nichtallergischer Kontakturtikaria:

Bei der allergischen Kontakturtikaria handelt es sich um eine IgE-vermittelte Mastzelldegranulation. Als Antigene können eine große Vielzahl von Substanzen (z.B. Nahrungsmittel, Pflanzen, Medikamente, Externa und Industriestoffe) in Frage kommen (Henz *et al*, 1996).

Die nichtallergische (nichtimmunologische) Kontakturtikaria ist dagegen auf Stoffe

zurückzuführen, die direkt, d.h. IgE-unabhängig, eine Mastzelldegranulation hervorrufen oder selbst vasoaktive Wirkung haben. In diesem Fall kann somit eine Reaktion schon beim Erstkontakt auftreten, d.h. eine vorherige Sensibilisierung muss nicht erfolgt sein. Ebenso beeinflussen Menge und Konzentration der auslösenden Substanzen die Intensität der Beschwerden, was für eine IgE-vermittelte allergische Reaktion ebenfalls nicht typisch ist (Henz *et al*, 1996).

Zur Gruppe direkter Histaminliberatoren zählen z.B. DMSO und Inhaltsstoffe von bestimmten Pflanzen (z.B. Urticaceae, Euphorbiaceae) und Tieren (z.B. Bienen, Wespen, Raupen, Muscheln, Quallen u.a.). Vasoaktive Substanzen wie Acetylcholin, Serotonin und Leukotriene können unter Umgehung der Mastzellen direkt auf Gefäße, Muskeln oder Nerven wirken (Henz *et al*, 1996).

1.3.2 Bisherige Therapie bei Urtikaria-Patienten

Nach einer zwingend gründlichen Anamnese und einer meist komplexen Diagnostik erfolgt eine Therapie der Urtikaria, die im Wesentlichen an zwei möglichen Aspekten ansetzt (Henz *et al*, 1996):

1. kausal/kurativ: Identifikation und Behandlung der Ursache/ des Auslösers.
2. symptomatisch: Therapieansatz am Wirkungsort/ Zielgewebe der Mastzellmediatoren oder Meiden des Auslösers/ Agens.

Identifikation und Behandlung der Ursache.

Bei diesem therapeutischen Ansatz sind Diagnose und Therapie kaum voneinander zu trennen, weil eine wirkliche kausale Therapie eine gründliche Diagnostik mit Identifizierung des Auslösers voraussetzt.

Diagnostische Maßnahmen zur Identifizierung eines möglichen Auslösers sind z.B. der Pricktest, der Scratchtest, der Intrakutantest, der Reibetest, der Epikutantest, die Provokationsdiät, der autologe Serumtest, serologische Untersuchungen und andere (Henz *et al*, 1996; Fritsch, 2004). Nicht selten werden mehrere diagnostische Maßnahmen kombiniert, um letztlich den verursachenden

Auslöser aus der Vielfalt an Möglichkeiten zu identifizieren (Henz *et al*, 1996). Bei der Infekturtikaria beispielsweise werden die urtikariellen Hautreaktionen, durch die Therapie und Beseitigung des Infektes, zur Ausheilung gebracht.

Die Identifikation und die Behandlung der Ursache ist in vielen Fällen der chronischen Urtikaria bisher jedoch nicht möglich. Auch nach Identifikation der Ursache ist man vielfach nicht in der Lage, die Erkrankung kurativ zu therapieren und zur Ausheilung zu bringen, wie z.B. bei der autoreaktiven Urtikaria und der Autoimmun-Urtikaria.

Therapieansatz am Wirkungsort/ Zielgewebe der Mastzellmediatoren.

Die Verhinderung bzw. Milderung der Symptome am Zielorgan ist die gängigste Therapieform bei der Urtikaria. Vor der Entwicklung der Antihistaminika war dies nur durch schlecht wirksame Mittel möglich, wie kühlende Mixturen, evtl. mit Zusatz von Menthol (Henz *et al*, 1996).

Seit den 50er Jahren steht mit den Antihistaminika eine effektive und relativ nebenwirkungsarme pharmakologische Therapie der Urtikaria zur Verfügung, mit der eine urtikarielle Reaktion in fast allen Fällen wirksam unterdrückt werden kann. Histamin entfaltet seine Wirkung über vier verschiedene Rezeptoren (Henz *et al*, 1996):

- H1-Rezeptor: Gefäßpermeabilität ↑, Juckreiz, Kontraktion glatter Muskelzellen.
- H2-Rezeptor: Stimuliert die Sekretion der Magensäure, wird exprimiert von bestimmten Lymphozyten und basophilen Granulozyten.
- H3-Rezeptor: Lokalisiert auf basophilen Granulozyten, im ZNS und an freien Nervenenden in der Peripherie.
- H4-Rezeptor: Wirkung bisher unklar. Lokalisation: Knochenmark, Milz, Lunge Leber, Leukozyten (Coge *et al*, 2001; Liu *et al*, 2001; Oda und Matsumoto, 2001)

Mit wenigen Ausnahmen werden praktische alle Symptome der Urtikaria über den H1-Rezeptor für Histamin vermittelt. Dementsprechend bedeutsam sind die H1-Antagonisten bei der Therapie der Urtikaria (Henz *et al*, 1996). Man unterscheidet die älteren Antihistaminika wegen ihrer sedierenden Wirkung von einer zweiten

und dritten Generation, die in jüngster Zeit entwickelt wurde und die kaum unerwünschte Nebenwirkungen auf das ZNS (Zentral-Nerven-System) haben.

Weitere Therapiemöglichkeiten bestehen in der Verabreichung von Kortikosteroiden (z.B. Prednisolon). Sie sind in der Regel nur im Notfall indiziert oder werden zur Kurzzeit-Therapie eingesetzt. Kortikosteroide finden auch bei Urtikariaformen Anwendung, bei der Antihistaminika nicht oder nur schlecht wirken, wie z.B. bei der verzögerten Druckurtikaria (Henz *et al*, 1996).

1.4 Derzeitiger Stand der Forschung

Nach derzeitigem Stand der Forschung ist bekannt, dass Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen, wie die Hashimoto-Thyreoiditis oder der Morbus Basedow, gehäuft bei Patienten mit chronischer Urtikaria auftreten. Die Prävalenz liegt bei etwa 12-50% (Leznoff *et al*, 1983; Napoli und Freeman, 2001; Zauli *et al*, 2001; Kullavanijaya *et al*, 2002; Bakos und Hillander, 2003; Greaves, 2003).

Wie von mehreren Autoren beschrieben, sind Auto-Antikörper der Klasse IgG im Serum von CU-Patienten gehäuft nachgewiesen worden. Anti-FcεRI-Auto-IgG und anti-IgE-Auto-IgG aus CU-Patientenseren wurden an Mastzellen und Basophilen von gesunden Kontrollpersonen in Histaminfreisetzungsversuchen getestet. In beiden Fällen kam es zur Degranulation. Auch im autologen Serumtest kam es zur Ausbildung urtikarieller Effloreszenzen (Grattan *et al*, 1991; Hide *et al*, 1993; Niimi *et al*, 1996).

Anti-TPO-Auto-IgE-Antikörper wurden von einer Gruppe um Bar-Sela bei einer CIU-Patientin nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass diese anti-TPO-Auto-IgE-AK mit einer Peroxidase, z.B. aus dem Essen, quervernetzt werden und urtikarielle Reaktionen hervorrufen könnten (Bar-Sela *et al*, 1999). In einer Studie

von Tedeschi et al. wurden 23 CIU-Patienten, die positiv für anti-TPO-IgG waren, auf anti-TPO-IgE untersucht. Keiner dieser Patienten hatte anti-TPO-IgE-Antikörper in messbarer Konzentration (Tedeschi *et al*, 2001). Bisher konnte die anti-TPO-Auto-IgE-AK Detektion von keiner weiteren Arbeitsgruppe wiederholt werden.

Zu funktionellen Eigenschaften und klinischen Studien über anti-TPO-IgE-Antikörper liegen in der Literatur bislang noch keine aussagekräftigen Ergebnisse vor.

2. Ziel der Untersuchung

Ziel der Arbeit ist es,

- 1. Patienten mit chronischer Urtikaria hinsichtlich des Auftretens von Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen und Auto-Antikörpern gegen Schilddrüsenantigene zu charakterisieren.**
- 2. zu prüfen, ob bei CU-Patienten IgE-Auto-Antikörper gegen Schilddrüsenantigene nachweisbar sind, und ob solche Antikörper funktionell relevant sind.**
- 3. autoallergische Reaktionen als bisher unbekannten Mechanismus der Entstehung einer Nesselsucht vor dem Hintergrund der relevanten Literatur zu diskutieren.**

3. Material und Methoden

3.1 Zellen

3.1.1 Sp2-Myelomhybridzelllinie

Die Sp2-Myelomhybridzelllinie wurde uns freundlicherweise von S.

überlassen.

Es handelt sich um transfizierte murine Myelomzellen, die rekombinantes humanes IgE-anti-TPO (h-IgE-anti-TPO) sezernieren. Diese spezifischen h-IgE-anti-TPO wurden bei Degranulationsversuchen und ELISAs als Positivkontrollen eingesetzt. Die Zellen wurden in IMDM (Iscoves Modified Dulbecco Medium, SIGMA) bei einem Titer von 300.000-400.000 kultiviert (37°C, 5% CO₂) und alle drei Tage wurde der Titer überprüft, sowie die Sterberate bestimmt. Die Sterberate schwankte zwischen 3-56%. Bei einer Vermehrung der Zellen auf über 1.000.000/ml wurden die Zellen gesplittet und neu gefüttert, mindestens aber alle 7-9 Tage. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (1100U/min., Raumtemperatur[RT], 7-10 min.), der Überstand gewonnen, und das entstandene Pellet (die Zellen) wurde in frischem Medium resuspendiert (Titer von 300.000-400.000 Zellen/ml). Der Überstand mit dem h-IgE-anti-TPO wurde aliquotiert, mit einer Chargen-Nummer und Datum versehen und bei -80°C eingefroren. Die IgE-Gesamtkonzentration des Sp2-Zellkulturüberstandes wurde im Standard-RAST-Verfahren (Radioallergosorbenttest) ermittelt, das vom Klinischen Labor für Allergologie der Universitäts-Hautklinik Mainz durchgeführt wurde. Der IgE-Titer des Sp2-Zellkulturüberstandes betrug 22 IU/ml.

3.1.2 RBL-Rattenbasophile

Rattenbasophile (Rat basophil leucaemia 2H3 cells) wurden uns freundlicherweise von

überlassen. Diese RBL-2H3 Zellen wurden mit dem Genkonstrukt für die alpha-Kette des humanen FcεRI-Rezeptors transfiziert (Gilfillan *et al*, 1992). An diesen

Zellen wurden Degranulationsversuche mittels des β -Hexosaminidase Assays durchgeführt. Die RBL Zellen wurden mit Earles-Salt Minimal Essential Medium (EMEM, SIGMA) in Zellkulturflaschen kultiviert und wuchsen streng adhärent am Flaschenboden. Sie ähnelten dem Aussehen nach unter dem Mikroskop Fibroblasten. Im Medium „frei schwimmende“ Zellen waren in der Regel tot.

Den transgenen Zellen wurde Geneticin (G418, Gibco; SIGMA, 1mg/ml Endkonzentration) als „Selektions-Agens“ hinzugeführt, und sie wurden dann mit 1100U/min., bei RT für 7-10min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet (die Zellen) wurde in 10-20ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium (80cm²/max. 10ml; 162cm²/max. 40ml) überführt, so dass die Zellsuspension einen Titer von 100.000 Zellen/ml hatte. Innerhalb von 2 Stunden setzten sich die Zellen ab und wuchsen adhärent weiter.

Sobald der Flaschenboden vollständig mit Zellen bedeckt war, oder Tendenzen zur Überwucherung zeigte, wurden die Zellen geerntet und zu Versuchszwecken benutzt oder gesplittet und rekultiviert. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgekippt und der Flaschenboden mit PBS-Puffer gespült, um restliches Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe einer 0,05%igen Trypsin/0,02%EDTA-Lösung (80cm²/10ml; 162cm²/40ml) vom Flaschenboden gelöst, indem man nach 5 minutiger Inkubation mit der Handfläche vorsichtig gegen den Flaschenboden klopfte, oder vorsichtig einen Zellschaber benutzte. Man erkannte makroskopisch das Ablösen der Zellen durch Eintrübung der Lösung.

Die Zellen durften keinesfalls länger als 10min. in der Trypsin/EDTA-Lösung verweilen, da Trypsin die Membranproteine zerstört und die Zellen irreversibel schädigt. Die Proteine des Fc ϵ RI-Rezeptors sind allerdings nicht Trypsin-empfindlich und daher nicht gefährdet.

Nach Ablösen der Zellen wurde sofort die äquivalente Menge an Medium hinzugefügt, um das Trypsin zu neutralisieren. Anschließend wurde diese Zellsuspension zentrifugiert (1100U/min., RT, 7-10min.). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl/ Sterberate bestimmt und die Zellen bei einem Titer von 100.000 Zellen/ml rekultiviert (Zellkulturschrank, 5% CO₂, 37°C).

Zur Bestimmung des Titors und der Sterberate wurden 100µl Zellsuspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit Evans-Blau gefärbt und unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer getrennt (lebendig/ tot) gezählt. Die Sterberate schwankte zwischen 1-29%.

3.2 Geräte und Instrumente.

Tabelle 3: Geräte und Instrumente.

Gerät	Fabrikat	Hersteller-Lieferant
Air Flow, Sterilbank	Hera-Safe2010/1.8	Heto-Holten A/S ALLERD (Dänemark) HERAEUS
Elektrophorese	Hoefer SE 260 Mighty	Pharmacia (D-Freiburg)
ELISA-Microwave Plate-Reader	Multiscan Ascent	Thermo Labsystems OY (Turku, Finland.)
FPLC-System:	GP-250 Gradientcontroller	Pharmacia AB, (Uppsala, Schweden)
	P-500 Kolbenpumpen (2 Stück)	
	UV-1 Monitor	
	Frac-100 Fraktionssammler	
	V-7 Valve	
	Rec 482 Zweikanalschreiber	
Zellkulturschrank	Hera Cell 240 Function Line	HERAEUS
Microplate Reader	Model450	BIO RAD
Photometer	Biophotometer Eppendorf Multiscan Ascent	Thermolab Systems, (Turku, Finland).
ProteinG 4B Säule	Vol. 1ml, IgG-Bindungs- kapazität: 25mg/ml.	Pharmacia AB, (Uppsala, Schweden)

Rüttler mit Temperaturfunktion	CertomathH für Temperatur CertomatU für Bewegung	BRAUN
Schüttler	MELB1719 Rotamax 120 Polymax 2040	MERCK Heidolph Instruments Heidolph Instruments
Transfer Unit (Western Blot)	Hoefer TE Mighty Small	Pharmacia (D-Freiburg)
Umkehrmikroskop	DM IL	LEITZ
Zentrifugen	Biofuge primo R RC 5Cplus Rotina 46RC	HERAEUS, Kendro HETTICH
	Multifuge 3 LR	HERAEUS, Kendro
	Megafuge 1.0	SORVALL
	Minnifuge RF	

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial.

Verbrauchsmaterial		
Zentrifugenfilter	Centricon, Centriplus YM100 100kd, YM30 30kd Porengröße	Amicon MILLIPORE
Zentrifugenröhrchen	Centri tubes	NALGENE
Cellstar PP Test tubes	steril; 50ml und 15 ml; cat. # 227261	Greiner Bio-one
ELISA-Platte	carbohydrate binding plate	Costar
ELISA-Platte	Maxisorp 96 well plate	Nunc Brand Products
Kulturplatte,(Gewebe-)	Cellstar Tissue Culture Plate, 96 Well, flat bottom, steril	GRAINER Bio One
Kulturplatte,(Gewebe-)	Multi Dish, 6 Well	Nunclon Delta Surface, BRAND
(S-) Monovette zur Serumgewinnung	7,5ml, Z-Gel	Sarstedt, D-Nümbrecht

Zellkulturflaschen	1. Cellstar Tissue Culture Flakes, 175cm ² , Filter Cap 2. TC Flask, 80cm ² , Filter Cap	GRAINER Bio One Nuncclon Delta Surface, BRAND
carbobind 96well microtiterplate	Costar	Corning BV Utrecht

3.3 Chemikalien und Antikörper

Tabelle 5: Chemikalien und Antikörper.

A23187 Calciumionophore	cat. # C-7522	SIGMA
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbezthiazolin)-sulfonsäure	SIGMA
AmDex-Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Cat. # RPN 4401	Amersham Pharmacia
Anti-human-FcεRI-AK		Upstate biochemicals, Charlottesville VA, USA
Anti-human TPO mouse-MAK, clone 2D11	Cat. # 8912-5059	Biotrend GmbH Köln, Germany
Anti-human TPO mouse-MAK, clone TP47	Cat. # 6010-S1	Bio Cytex Marseille, France
Anti-mouse-IgG (biotinylierter Esels-AK)	Cat. # R-1348 B	DPC-Biermann GmbH Bad Nauheim, Germany
Bis-Acrylamid-Gel	SDS	SIGMA
BSA (Albumin bovine Fraction V)	100g, Enzym free #11927	SERVA Electrophoresis GmbH, D-Heidelberg
EAH-Sepharose 6B		Amersham-Pharmacia AB, Upsala, Schweden

ProteinG-Sepharose 4B in FPLC-Säule		Amersham-Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
Streptavidin (Peroxidase) from <i>Streptomyces avidinii</i>	Cat. # 4762	SIGMA
Streptavidin (Peroxidase) - horseradish	Cat. # RPN 4401V	Amersham Biosciences
TPO (Thyreoperoxidase) – mikrosomales human ~		Brahms Diagnostica GmbH, Berlin, Germany
TPO (Thyreoperoxidase) – rekombinantes human ~		Rees Smith Research-Biochemicals Ltd., Cardiff, UK
Ziegen-IgG-anti-human-IgE (ε-Fc-chain specific)	cat. # I-0632	SIGMA

3.4 IgE-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die IgE-Aufreinigung diente dazu, störende Komplementfaktoren oder andere Immunglobuline wie z.B. das IgG zu entfernen, die die Versuchsergebnisse verfälschen könnten. Zudem sollte die geringe IgE-Serumkonzentration durch Einengungs- und Reinigungsschritte erhöht werden. Zur IgE-Aufreinigung wurden als erstes Zentrifugenfilter (Centricon, Centriplus YM100 100kd, YM30 30kd Porengröße, Amicon MILLIPORE) zur Vorreinigung benutzt, dann Sephadex G25 Säulen, um die Suspension zu entsalzen, und anschließend wurde die Suspension über eine ProteinG Säule (FPLC-System, GP-250 Gradientcontroller, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) gereinigt (Kadooka *et al*, 2000).

Die Immunglobulin E-Suspension (Überstand der transgenen Sp2-Mausmyelomzellen oder Serum von CU Patienten) wurde in ein Zentrifugenfiltrerröhrchen (Centricon) gefüllt und bei 10000g für 10 min. bei RT zentrifugiert (Hettich RC46), um makroskopische Bestandteile vorab zu entfernen. Danach wurde eine Proteinfällung durch schrittweises Zugabe von Ammoniumsulfat (bis zu 60%) durchgeführt und anschließend erneut zentrifugiert

(1 Stunde bei 4°C, 3000g). Das entstandene Protein-Pellet wurde in 2,5ml des Puffers A (0,05M Tris/HCl pH 7,8, 150mM NaCl) resuspendiert und über eine entsprechend mit Puffer A umgepufferte Sephadex G25 Säule entsalzt. Das resultierende Eluat wurde in Nalgene Ultrazentrifugenröhrchen (0,5ml/ Röhrchen) bei 8000g, für 2x 15min, und 4°C zentrifugiert (Kendro Biofuge) und konzentriert, bis ein Retentionsvolumen von 150-300µl pro Röhrchen erreicht wurde. Der gesamte Proteinüberstand wurde mit Puffer A auf ein Endvolumen von 500µl verdünnt. Das filtrierte Eluat, in dem sich Moleküle kleiner 100kD (kilo Dalton) befanden, wurde zunächst bei -80°C eingefroren und später verworfen, nachdem geprüft wurde, dass mit Sicherheit keine Immunglobuline vorhanden sind.

Im nächsten Schritt wurde die gesamte (anti-TPO-) IgG-Fraktion von der Immunglobulin-Suspension getrennt. Dies erfolgte durch die Affinitätschromatographie mittels einer ProteinG Säule (Sephacrose 4B Säule, 1ml, IgG-Bindungskapazität: 25mg/ml, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) in einem FPLC-System (FPLC-System, GP-250 Gradientcontroller, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) mit einer Durchflussrate von 0,5ml/min. Das Eluat, welches die Haupt-IgE-Fraktion enthält, wurde aufgefangen, der pH-Wert und die Proteinkonzentration (Bradford-Reagenz) gemessen und anschließend bei -80°C eingefroren.

Um die ProteinG-Säule abzusättigen, wurde die Säule mit einer bovinen IgG-Pufferlösung beladen (20ml, 1mg/ml bovines IgG) und anschließend mit 10-fachem Säulenvolumen an Puffer A „durchgespült“. In den folgenden Schritten wurde das IgG wieder von der Säule getrennt. Schrittweise erfolgte hier eine Elution von IgG-gebundenem IgE durch einen schwach sauren pH Gradienten (Kadooka *et al*, 2000).

Nach 18 min. der Durchflusszeit wurde ein Puffergradient von 40% erreicht. Nach 54min. 60%, nach 63min. 90% und nach 69min. 100% (Durchfluss von 0,5ml/min). In Abhängigkeit von dem Gradienten änderte sich der pH-Wert in der Säule, wodurch letztendlich das IgG gelöst wurde. Zu Beginn lag der pH-Wert bei 7,8. Nach 40% Austausch durch Puffer B lag der pH-Wert bei 6,5 nach 60% Austausch bei 3,2 und nach 93% Austausch bei 2,8. Zu diesem Zeitpunkt und bei diesem pH-Wert ist das gesamte IgG von der Säule gelöst. Eine mögliche IgE-Fraktion, die durch anti-IgE-AK (IgG) gebunden ist, wurde als Durchfluss bei etwa pH 4- pH 3,5

erwartet. Die einzelnen Durchflussfraktionen wurden sofort mit 1M Tris/HCl-Puffer, pH 9,2 auf neutralen pH-Wert von etwa 7,8 umgepuffert.

Die einzelnen Proteinfractionen wurden bei -80°C eingefroren und gelagert. Die anschließende anti-TPO-Immunglobulin-Detektion wurde mit dem ELISA-Verfahren durchgeführt (Peng *et al*, 1994; Kadooka *et al*, 2000).

3.5 TPO-Biotinylierung

Bei der TPO-Biotinylierung wird durch den Reaktionsvorgang Biotin mit dem Enzym TPO gekoppelt, um dann dadurch über mehrere Bindungsstellen mit Streptavidin eine Aktivierung der Effektorzelle zu ermöglichen.

Die vorhandene h-TPO Menge beträgt 2 x 0,5 mg/500 µl (Konzentration von 1 mg/ml). Eingesetzt wurden 400 µl h-TPO-Suspension in einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Dies entspricht 200 µg bzw. 2,06 nmol. Zum Umpuffern wurden Sefadex G-25 Säulen (Biospin) in entsprechender Anzahl verwendet und zuvor viermal mit PBS-Puffer umgepuffert. Es wurde dann jede Säule mit 100µl der h-TPO Suspension beschickt und anschließend zentrifugiert (bei 1000g, 5 min., 4°C).

Es resultierten 440µl Eluat, das mit 48µl 1M Na-Bikarbonat-Lösung (NaHCO₃) versetzt wurde (Endkonzentration: 100mMol). Das NaHCO₃ wirkt als Katalysator der Biotinylierungsreaktion. Dem h-TPO wurde dann 8µl Biotin-di-(ε-aminocapronyl)-N-hydroxysuccinimid (Biotin-XX-NHS) der Konzentration 1mg/ml zugegeben. Dies entspricht ca. 8,5µg bzw. 12,7nmol Biotin, d.h. das 6-fache der h-TPO-Molarität. Dann wurde für 60-90 min. bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt, indem das überschüssige Biotin entfernt wurde. Dazu wurden je 250µl der Reaktionssuspension auf eine Biospin6-Säule gegeben und nach Einsickern zentrifugiert, bei 1100g, 5 min., 4°C. Das Eluat mit dem TPO-Biotin wurde in entsprechenden 2ml Sammelgefäßen aufgefangen. Es resultierten 400µl Eluat und anschließend wurden zwei Messungen durchgeführt:

1. Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford Reagenz.
2. Überprüfung der Funktionalität bzw. Bindungskapazität des TPO-Biotins mittels IgE-anti-h-TPO-capture ELISA.

Die erste Messung der Proteinkonzentration mit Bradford Reagenz ergab eine Gesamtmenge an Biotin-TPO von 65µg in 400µl. Dies entspricht 32,5% der ursprünglich eingesetzten TPO Menge.

Die zweite Messung mit dem anti-h-TPO-capture ELISA bestätigte die Funktionalität und ergab eine konzentrationsabhängige Bindungs-/Färbereaktion.

3.6 Direkter ELISA

Der direkte ELISA wurde im Standard-ELISA-Verfahren durchgeführt (Malaviya *et al*, 1982; Layton und Smithyman, 1983).

Eine ELISA-Platte (Nunc Maxisorp 96-well) wurde mit 100µl/Slot rekombinanter-humaner-Thyreoperoxidase (rec-h-TPO, 1µg/ml in 100mM NaHCO₃/Na₂HPO₄, 0,01% BSA, pH 9,2) beladen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBT005 (0,005% Tween20 in PBS) wurden die freien Bindungsstellen der ELISA-Platte mit 2% BSA in PBS geblockt. Nun wurde wie nach jedem weiteren Inkubationsschritt erneut 3mal mit PBT005 gewaschen. Danach wurden die Proben bzw. Patienten-Seren in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:125 und der Sp1,4-Überstand mit anti-human-TPO-IgE als Standard zur Ermittlung einer Eichkurve in einer Verdünnung von 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243 usw., aufgetragen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurde ein Fc-biotinylierter anti-human-IgE-IgG (Goat), 1:1000 in PBT002 verdünnt, aufgetragen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde mit einer Streptavidin-Peroxidase (horseradish), in einer 1:4000 (PBT002) - Verdünnung, für etwa 1 Stunde bei RT, inkubiert.

Die enzymatische Farbreaktion wurde mit 0,02% ABTS in 20mM Na-Zitrat-Puffer (pH 5,0) und 0,02% Hydrogen-Peroxidase gestartet und nach 30 min.

Inkubationszeit durch die Zugabe von 1% SDS (sodium-dodecylsulfate) wieder gestoppt.

Das Ergebnis der Farbreaktion wurde in einem Ascent Multiscan ELISA-Reader bei 405nm (Thermolab Systems, OY, Turku Finland) gemessen.

3.7 Indirekter (capture) site directed IgE-anti-TPO-ELISA.

Der human-IgE-capture-ELISA wurde zum Nachweis von IgE-anti-TPO entwickelt und eingesetzt. Er besitzt eine erhöhte Sensitivität für das spezifische IgE-anti-TPO gegenüber dem konventionellen ELISA. Der capture-ELISA gliedert sich in folgende Schritte:

- a) Aktivierung des Primärantikörpers.
- b) Coating (beladen der 96-Well Platte, carbo-bind >Costar<)
- c) Blocking (Absättigung der freien unspezifischen Bindungsstellen)
- d) Antibody (h-IgE) capture (Proben, (+)-Kontrolle, Standards, „blanks“, Eichkurve)
- e) Antigenzugabe (mikrosomales bzw. rekombinantes TPO)
- f) Konjugatzugabe/ Sekundärer-AK gegen das Antigen TPO
- g) Markierungsreaktion (biotinylierter AK gegen den sek.-AK)
- h) Zugabe des Amdex-Streptavidins
- i) Enzymatische Farbstoffreaktion
- j) Photometrische Messung und Kalibrierung

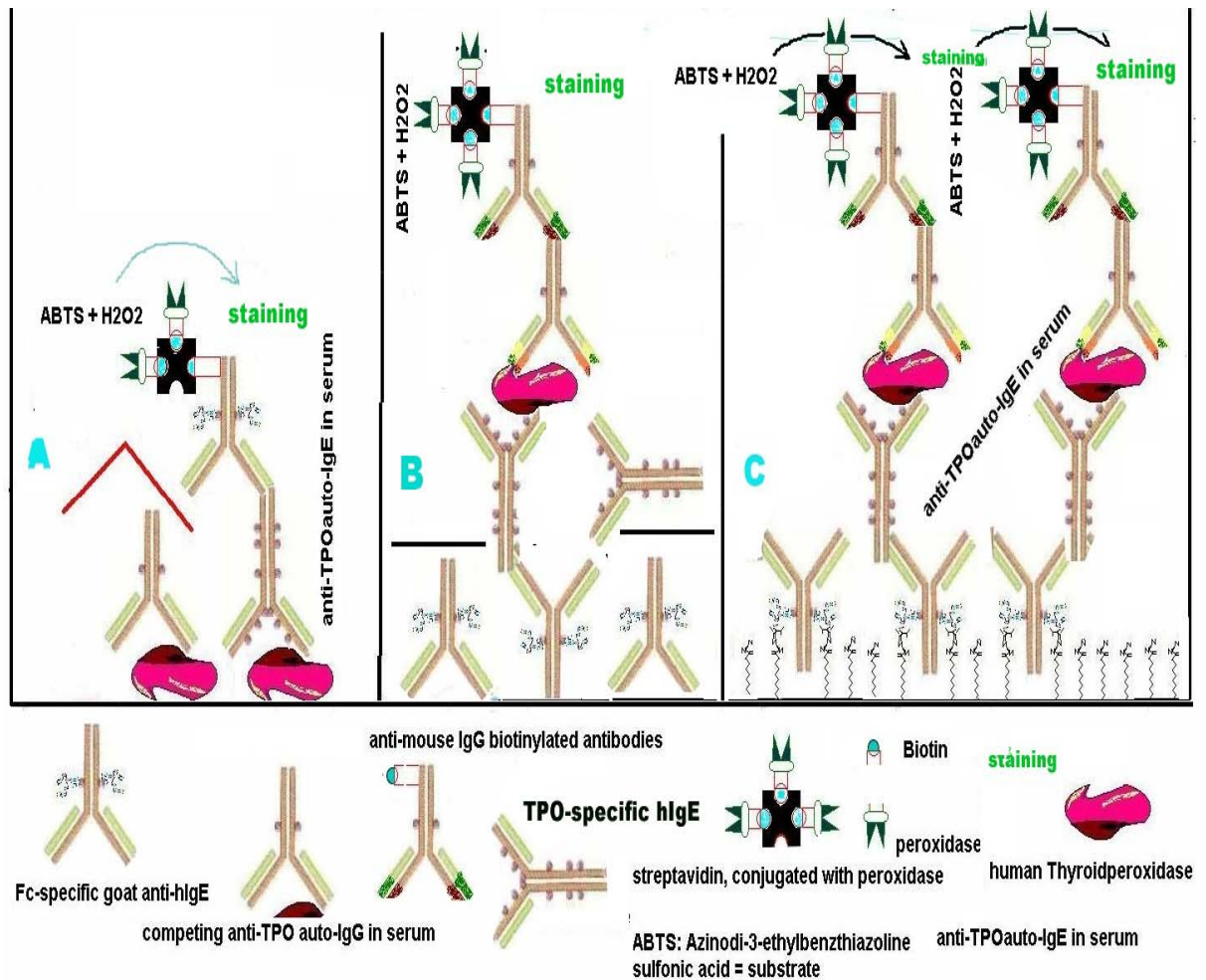


Abbildung 4: Prinzip des ELISA.

- A Direkter ELISA
- B Indirekter ELISA
- C Neuer site directed IgE-anti-TPO ELISA

a) Aktivierung des Primärantikörpers

Bei dem gekauften Primär-AK war nur das Volumen, nicht jedoch die Konzentration bekannt. Daher wurde zuerst die Proteinkonzentration des anti-h-IgE-Ziegen-IgG (Fcε-spezifisch) mit Bradford-Reagenz bei 595nm im Eppendorfphotometer (Biophotometer Eppendorf, Multiskan Ascent, Thermolab Systems, Turku, Finnland) gegen eine Eichkurve aus IgG-Standards gemessen. Eingesetzt wurden: 1cm Plastikkuvetten, 2ml Bradford-Reagenz + 10µl des unverdünnten Antikörpers. Für eine zuverlässige Konzentrationsbestimmung wurden mindestens 3fach Proben gemessen.

Zur Aktivierung wurden 2ml des anti-h-IgE-Ziegen-IgG (1mg/ml) eingesetzt und 3,2ml 15mM Natriumperjodat (NaJO_4) in 100mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5), langsam über einen Zeitraum von 10min. zugegeben (100mM Na-Acetat-Lösung pH 5,5 im Verhältnis von ca. 1:1,5 zugeben). Das Na-Perjodat (NaJO_4) wurde zugeführt, um die freien OH-Gruppen der Kohlenhydrate, die an den schweren Ketten der AK hängen, zu oxidieren, was zur Bildung hochreaktiver Dicarbonylgruppen führt. Diese hochreaktiven Dicarbonylgruppen reagieren mit dem Hydrazin der carbo-bind plate und stellen die covalente Bindung zwischen AK und ELISA-Platte her. Die Suspension wurde während der Reaktion auf einem Magnetrührer langsam vermischt und anschließend für weitere 80min. unter ständigem Rühren inkubiert.

Zwischenzeitlich wurden zwei Sephadex G-25 Säulen (amersham-pharmacia) mit je insgesamt 25ml 100mM Na-Acetatpuffer pH 5,5 (ohne NaJO_4) umgepuffert.

Nach insgesamt 90min. Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 320 μl Ethylenglykol (178mM) abgestoppt (konzentriertes Ethylenglykol 17,8M mit aqua bidest 1:100 verdünnt). Dann wurde das Gemisch (vol. ca. 5,6ml) auf die beiden Sephadex G-25 Säulen verteilt (2,75ml je Säule). Anschließend wurden jeweils 3,5ml 100mM Na-Acetatpuffer (ohne NaJO_4) hinzu pipettiert und das Eluat, in dem sich nun der AK befand, in einem geeigneten Gefäß aufgefangen. Durch diese Sephadex Elution wurden alle Salze, einschließlich des Natriumperjodats in der Säule zurück gehalten, wohingegen der AK schnell mit der ersten Fraktion eluiert wurden.

Bei 1mg/ml IgG Ausgangskonzentration lag die Konzentration an peroxidiertem IgG im Eluat bei ca. 357 $\mu\text{g/ml}$. Das Eluat wurde dann mit 100mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) auf eine IgG-Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und in Aliquots zu je 400 μl (100 μg IgG) aufgeteilt. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

b) Coating

Bei dem Coating wurde eine carbohydrate binding plate (Costar) mit dem Primär-AK beladen, der sich covalent an die Platte bindet. Die eingesetzte anti-h-IgE-Ziegen-IgG Konzentration für diesen capture ELISA betrug 10 $\mu\text{g/ml}$. Ein Aliquot (100 $\mu\text{g/ml}$) wurde auf 10ml mit Na-Acetatpuffer aufgefüllt und in jedes Slot der

ELISA-Platte 100µl einpipettiert. Dabei wurde eine Reihe (z.B. die letzte) bzw. 8 Wells freigelassen zur Messung von unspezifischen Bindungsreaktionen.

Es wurde für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und einmal mit PBT005 (250µl/ Slot) gespült.

c) Blocking

Nach dem Spülen wurden 250µl einer 3%igen BSA in PBS (20% FCS)-Lösung in jedes Slot einpipettiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Es wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und dreimal mit PBT005 (250µl/ Slot) gespült.

d) Antibody (h-IgE) capture (Proben/ Seren)

Es wurden nun die Proben/ Seren, die das IgE-anti-TPO enthielten, zugegeben.

Das IgE-anti-TPO wurde über das anti-h-IgE-Ziegen-IgG an die Platte gebunden.

Die eingesetzten Seren der Patienten wurden zuvor mit 10% FCS in PBS (alternativ: 1% BSA in PBT0025) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Diese Verdünnung wurde in vorherigen Versuchen mit mehreren Verdünnungsreihen und unterschiedlichen Verdünnungsmedien getestet und ausgewählt. Bei dieser Verdünnung waren ausreichende Konzentrationen, funktionelle Spezifität und klar messbare IgE-Detektion des Serums (IgEs) vorhanden, während unspezifische Reaktionen nicht/ nur gering messbar waren. Folgende Verdünnungsreihen wurden getestet: 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

Es wurden je Serum dreifach Proben angesetzt (300µl), je Slot 100µl (verdünntes) Serum. In einer Reihe (8 Wells) wurde zur (+)-Kontrolle ein IgE-anti-TPO Standard (Fab/Sp2 Klon S. McLellan) mitgetestet (100µl/Slot). Die Konzentration an IgE-anti-TPO betrug 22 IU/ml (gemessen im CAST-ELISA durch das klinische Allergielabor der Uniklinik Mainz). Der Standard wurde in Form einer Verdünnungsreihe aufgetragen (1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729, 1:2187) und später zur Kalibrierung bzw. Erstellung einer Eichkurve verwendet.

Es wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und dreimal mit PBT005 (250µl/ Slot) gespült.

e) Antigenzugabe (mikrosomales bzw. rekombinantes TPO)

Als TPO-Antigen kam zum einen mikrosomales TPO (μ -TPO, Brahms Diagnostica GmbH, Berlin) und zum anderen rekombinantes TPO (r-TPO, Rees Smith Research-Biochemicals Ltd., Cardiff, UK) zum Einsatz. Diese beiden Antigenpräparate unterscheiden sich wie folgt voneinander. Das μ -TPO, das aus humanen Schilddrüsen gewonnen wurde, zeigt eine höhere Sensitivität, während das r-TPO eine höhere Spezifität aufweist. Es wurden 10 μ g/ml TPO auf 10 ml mit 1% PBT0025 verdünnt (Konzentration 1 μ g/ml). Davon wurden 100 μ l in jedes Slot pipettiert. Es wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und dreimal mit PBT005 (250 μ l/ Slot) gespült.

f) Konjugatzugabe/ Sekundärer AK gegen das Antigen TPO

Eingesetzt wurde der monoklonale Maus-anti-TPO-AK Klon TP47 (Bio Cytex Marseille, France) und der Klon 2D11 (Biotrend GmbH, Köln).

Als sekundärer AK gegen das TPO wurden zwei Klone eingesetzt, damit alle TPO-Antigene erkannt und erfasst wurden. Der Standard anti-TPO-IgE konkurriert mit dem TP47-Klon um die selbe Bindungsdomain an dem TPO, daher wurde zusätzlich der zweite Klon 2D11 eingesetzt.

Für eine optimale Konzentration wurden beide AK 1:1.000 verdünnt. D.h. je 10 μ l Antikörper wurden mit 10ml 1% BSA in PBT0025 verdünnt. Davon wurden dann je 100 μ l in ein Slot pipettiert, mit Ausnahme eines Slots in der Kontrollreihe.

Es wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und dreimal mit PBT005 (250 μ l/ Slot) gespült.

g) Markierungsreaktion (biotinylierter AK gegen den sekundären AK)

In diesem Schritt wurde der biotinylierte anti-Maus-Esels-AK (DPC-Biermann GmbH Bad Nauheim, Germany) hinzugegeben, um das Antigen (TPO) „indirekt“ zu detektieren. Der anti-Maus-Esels-IgG-AK wurde 1:10.000 mit 1% BSA in PBT0025 verdünnt (1 μ l auf 10ml). Davon wurden dann in jedes Slot 100 μ l pipettiert. Es wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und dreimal mit PBT005 (250 μ l/ Slot) gespült.

h) Zugabe des Amdex-Streptavidins (Peroxidase)

Amdex Streptavidin-horseradish Peroxidase (Amersham Biosciences) wurde 1:2.000 mit 1%igem BSA-PBT0025 Puffer verdünnt und jeweils 100µl in jedes Slot pipettiert. Es wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und dreimal mit PBT005 (250µl/ Slot) gespült.

i) Enzymatische Farbstoffreaktion

Zu Beginn der enzymatischen Farbstoffreaktion wurden je 50µl der Wasserstoffperoxidlösung in jedes Slot pipettiert (0,02% H₂O₂ in 20mM Citratpuffer, pH 5,5). Als nächstes wurde dann jeweils 50µl der ABTS-Lösung (0,02% ABTS in 20mM Citratpuffer, pH 5,5) in jedes Slot pipettiert.

Nach der Inkubation (bei RT für 30min.) wurde sofort die Messung gestartet und zuvor die Reaktion mit je 100µl/Slot 1%ig SDS in H₂O abgestoppt.

Wenn nach 60 min. noch keine Farbstoffreaktion (grün) erfolgt war, wurde das Ergebnis als negativ beurteilt, d.h. es befand sich kein Antikörper in der Probe/Serum. Später auftretende (grün-) Färbungen, die in der Regel rein chemisch und daher unspezifisch sind, wurden als negativ bewertet.

j) Photometrische Messung und Kalibrierung

Die Messung der ELISA-Platte erfolgte bei 405nm im Biophotometer (Multiskan Ascent, Thermolab Systems, Turku, Finnland). Die IgE-Standards (Fab/Sp2 Klon S. McLacian) wurden als Verdünnungsserie angesetzt und nun zur Kalibrierung verwendet/ eingegeben und dann eine Eichkurve erstellt. Die Nullproben des Kontrollstreifens wurden mit „blank“ benannt. Die Nullwerte wurden von den übrigen Werten abgezogen (blank subtraction), um die Werte der unspezifischen Reaktionen von denen der spezifischen Bindungsreaktion abzuziehen. Die Werte wurden in Excel importiert, ein Diagramm erstellt und die jeweiligen Konzentrationen an IgE-anti-TPO berechnet.

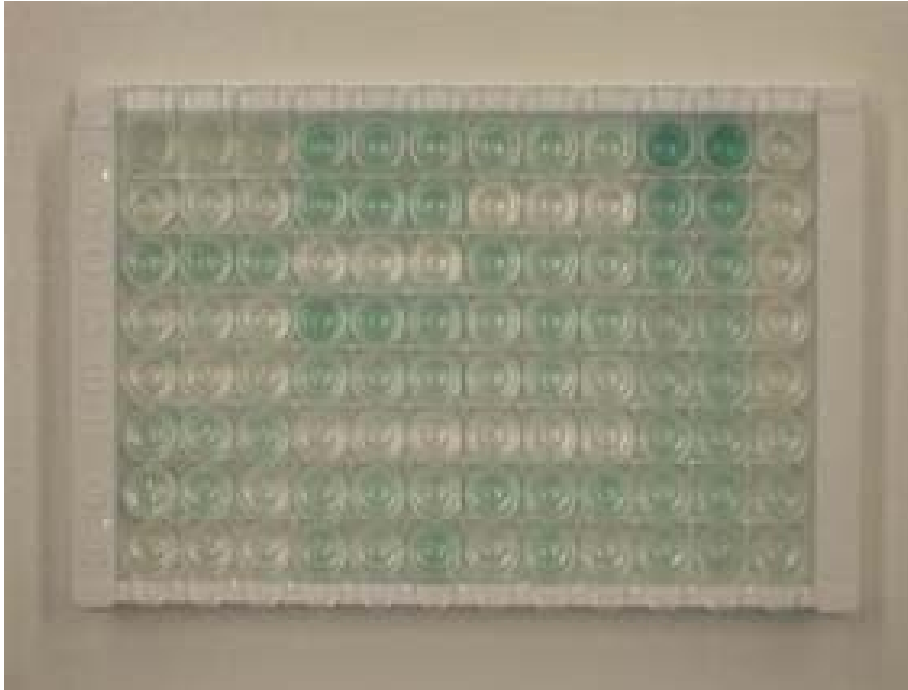


Abbildung 5: Ergebnis einer site-directed-TPO-ELISA-Platte.

Die Abb. zeigt eine ELISA-Platte unmittelbar nach Färbung und Messung in einem ELISA-Reader.

3.8 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Mit der SDS-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Ladung, aufgetrennt werden. Die Proteine wandern in einem Polyacrylamid-Gel eine unterschiedlich weite Strecke, abhängig von ihrem Molekulargewicht.

Mit dem Western Blot werden die Proteine, die im Gel unterschiedlich gelaufen sind, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und fixiert. Dort können die Proteine dann immunologisch durch spezifische Antikörper erkannt und anschließend gefärbt werden. Die Einordnung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht und die immunologische Detektion erlauben Aussagen darüber, um welches Protein es sich handelt, vorausgesetzt das Molekulargewicht des Proteins ist bekannt und kann anhand mitgelaufener Molekulargewichtsmarker identifiziert werden (Neville und Glossmann, 1974; Joshi *et al*, 1992).

SDS-Page:

Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hoefer SE 260 Mini-Vertical Unit. Jede Geltasche wurde mit 20µl der Proben (mikrosomales TPO, rekombinantes TPO) und zusätzlich mit einem Molekulargewichtsmarker (Rainbow Marker TM) beladen. Es wurden vier Versuchsreihen angesetzt, die zu einem späteren Zeitpunkt im Western Blot übertragen, fixiert und gefärbt wurden. Nachdem alle Proben aufgetragen wurden, wurde die Elektrophorese gestartet (bei 8°C, 150min., 30-40mA, 200V). Im Einzelnen wurden folgende Lösungen und Gele verwendet:

Acrylamid Stock: 75g Acrylamid, 2g N,N-Methylen-Bis-acrylamid, 250ml aqua dest²; Trenngel-Puffer: 1,5M Tris/HCl pH 9,2; Sammelgel-Puffer: 0,5M Tris/H₂SO₄ pH 6,8; Probenpuffer: 0,125M Tris/H₂SO₄ pH6,8, 50mM NaCl, 20% Glycerin, 0,2mg/ml Bromphenolblau, 1% 1M SH-EtOH, 0,1% Triton X-100; Elektrodenpuffer: 0,025M Tris, 0,192M Glycin pH 8,3; 10%ige SDS-Lösung: 1g SDS, 10ml aqua dest²; 10%ige AMPS-Lösung: 1g AMPS, 10ml aqua dest²; 8%iges Trenngel 9ml: 2,4ml Acrylamid Stock, 2,25ml Trenngel-Puffer, 0,09ml, 10%ige SDS-Lösung, 0,09ml 10%iges AMPS, 4,18ml aqua dest². Für 10min. unter Vakuum rühren. Danach 7µl TEMED; 3%iges Sammelgel 10ml: 1,2ml Acrylamid Stock, 2,5ml Sammelgel-Puffer, 100µl, 10%iges AMPS, 6,2ml aqua dest². Für 10min. unter Vakuum rühren. Danach 5µl TEMED.

TEMED wurde erst nach dem Entgasen und unmittelbar vor dem Gießen der Gele hinzugefügt. Die Gele wurden dann in eine zuvor montierte Gelkassette (Hoefer Mini-Vertical Gel Casters) gegossen.

Western Blot:

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gel-Kassetten aufgebrochen, das Gel vorsichtig gelöst und auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Erst das Filterpapier, dazwischen das Gel und die Nitrocellulose-Membran, dann nochmalig das Filterpapier. Diese Sandwich-Anordnung wurde dann in Transfer-Puffer (25mM Tris, 192mM L-Glycin 20% EtOH pH 8,3) geblotet (Hoefer TE Mighty Small Transphor tank Transfer Unit, amersham pharmacia für 60min., 300mA, 80V). Nach dem Blot wurde eine Versuchsreihe mit Amiloschwarz

(Amiloschwarz 5mg/100ml in 10% Essigsäure, 20% abs. Ethanol, 70% aqua bidest) gefärbt. Die anderen drei Versuchsreihen wurden in einer 5%igen Milchpulver-TBST-Lösung ebenfalls über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen.

Am darauf folgenden Tag wurden die verbliebenen Versuchsreihen aus der Milchlösung herausgeholt und für 3x10min. mit TBST005 auf einem Schüttler gespült. Danach folgte die Immundetektion der Proteine/ Antigene, durch einen Antikörper, der spezifisch das TPO erkennt (Sp2-Überstand) oder Serum, um es auf IgE-anti-TPO zu testen. Dazu wurden die Versuchsreihen mit entsprechenden Antikörpern, in diesem Fall mit: 1. IgE-anti-TPO (Sp2-Überstand) 1:100, 2. Serum einer CU-Patientin 1:100, 3. Serum einer Kontroll-Person 1:100, für 90min. bei RT, auf einem Schüttler inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde dreimal mit TBST005 gespült. Anschließend wurde mit einem biotinylierten Ziegen-IgG-anti-human-IgE (1:400 in TBST005, pH 7,8) inkubiert und dreimal mit TBST005 gespült. Dann folgte die Inkubation mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat (1:000), beides für 90min. bei RT, auf einem Schüttler. Nach Zugabe von 50ml 0,02% Nitro blue tetrazolium in 150mM Tris/HCl pH 9,6 wurde die Farbreaktion mit BCIP (100µl 2M MgCl₂ and 20µl 0,2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) gestartet. Die Farbreaktion wurde nach max. 5-10min. durch Abspülen mit Wasser gestoppt.

Es zeigten sich nach der Färbung mehrere Banden, die anhand des Molekulargewichtsmarkers einem Molekulargewicht in kD (kilo Dalton) zugeordnet werden konnten. In diesem Fall z.B. 100 kD für TPO.

3.9 Beta-Hexosaminidase Assay

Beta-Hexosaminidase ist ein Enzym, das unter anderem die spezifische Freisetzung von N-acetyl-Glucosamin katalysiert. In Mastzellen und basophilen Granulozyten befindet sich das Enzym in den Granula und kann daher als messbarer Indikator einer Degranulation von humanen- und Nagetier-Mastzellen gemessen werden.

Als erstes wurde am Tag vor dem Versuch die entsprechende Anzahl an Fcε-RI-Rezeptor-exprimierenden RBL-Zellen den Kulturflaschen entnommen. Es wurden pro Ansatz/ Probe 250.000 Zellen verwendet. Die entnommenen Zellen wurden der Versuchsplanung nach in die verschiedenen Gruppen mit entsprechender Zellzahl aufgeteilt, die mit IgE vorinkubiert werden sollten, z.B. eine Gruppe mit IgE-anti-TPO (Stocklösung = 22IU/ml), eine Gruppe mit Seren der Probanden/CU-Patienten (0,7-20 IU/ml, Verdünnung 1:5 mit PBS-Puffer) und die Kontrollgruppe ohne IgE (Kontrolle A: Spontanrelease [Probenpuffer], Kontrolle B: Positiv-Kontrolle [max. Release mit A23187], Kontrolle C: Kontrolle des Fcε-Rezeptors [anti- human-FcεRI-AK], Kontrolle D: Spontanrelease des Antigens [TPO], Kontrolle E: Spontanrelease von Stopp- und Lysis-Puffer). Die Zellen wurden in einer 48-Well-Platte über Nacht im Zellkulturschrank (37°C, 5% CO₂) vorinkubiert, um den Zellen ein adhärentes Wachstum zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurden die Zellen dann nach IgE-Zugabe zur Inkubation für 3 Stunden in den Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zwei mal mit Proben-Puffer gewaschen (10mM Na-PIPES, 50mM NaCl, 2,5mM KCl, 0,4M MgCl₂, 0,67μM CaCl₂, 0,1% BSA and 0,1% β-D-glucose), um restliches IgE und Medium zu entfernen. Dann wurden die Stimulationslösungen hinzugefügt: μTPO (0,25μg in 250μl Probenpuffer), zur Negativkontrolle nur Probenpuffer, zur Positivkontrolle Calcium-Ionophor (A23187, 10⁻⁴M), anti-human-FcεRI-AK (Upstate biochemicals, Charlottesville VA, USA, 50ng/ml in 250μl Probenpuffer) und jeweils 250μl Stopp-Puffer (1,06% Na₂CO₃, 0,85% NaHCO₃, in Probenpuffer, pH 10,6) und Lysis-Puffer (5% Triton X100 in Probenpuffer). Die Inkubation erfolgte für 30min., bei 37°C und 5%CO₂.

Nach der Inkubation/Stimulation wurde der Überstand abpipettiert, in gekühlte Eppendorf-Tubes transferiert und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden nun mit 300μl Probenpuffer zweimal vorsichtig gewaschen, ohne durch zu kräftiges Spülen die adhärenen Zellen zu lösen. Danach wurde die äquivalente Menge zuvor entnommenen Überstands an Lysis-Puffer hinzugefügt, um die Zellmembranen zu zerstören und für weitere 15min. inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in ebenfalls gekühlte Eppendorf-Tubes transferiert. Nun wurden in eine 98-Well-Platte 10μl, 20μl und 30μl des Überstandes und des Lysates in jeweils ein Slot pipettiert, um die lineare Beziehung zwischen der Enzymaktivität und der Substratkonzentration zu messen. Die β-Hexosaminidase-Reaktion wurde durch

Zugabe von jeweils 50µl pNAG-Puffer (0,033% pNAG [para-Nitrophenyl-N-acetylglucosamine] in 100mM Phosphat/Zitronensäure Puffer, pH 4,5) gestartet (60min., 37°C, 5%CO₂). Anschließend wurde der Reaktionsvorgang durch Zugabe von 200µl Stopp-Puffer beendet. Eine stattgefunden enzymatische Reaktion konnte an der Gelbfärbung erkannt und im Photometer (Multiskan Ascent, 405nm, Thermolab Systems, Turku, Finnland) gemessen werden.

3.10 Entnahme von Venenvollblut bei CU-Patienten und Kontrollpersonen.

Die Entnahme von Venenvollblut erfolgte nach der üblichen Methode der Venenpunktion in der Ellenbeuge oder auf dem Handrücken, nach vorheriger Sprühdesinfektion und Venenstauung mittels eines Stauschlauches am Oberarm.

Es wurden von 300 CU-Patienten (Alter von 6 bis 90 Jahren, Verteilung, Frauen : Männer = 3 : 2) und 229 Kontrollpersonen (Alter von 14 bis 92 Jahren, Verteilung, Frauen : Männer = 2 : 3), die weder unter einer Urtikaria, noch unter einer SD-Autoimmunerkrankung litten, etwa 15ml Venenvollblut entnommen ([S-] Monovette, Sarstedt).

Das entnommene Blut wurde sofort zentrifugiert (1100U/min., 10min., bei RT, Hettich RC46), um die zelluläre Phase (Erythrozyten, Leukozyten und andere Zellen) vom Serum zu trennen. Das Serum wurde zu á 500µl in entsprechenden Kryoröhrchen (Cryovial PK100, Simport Plastics) aliquotiert und bei -80° gelagert.

Zur Detektion von IgE-anti-TPO wurde das oben beschriebene indirekte ELISA-Verfahren eingesetzt. Ausgewählte Seren wurden zu Stimulationsversuchen mit RBL-Zellen eingesetzt.

3.11 Statistische Analysen

Alle gemessenen Werte wurden in das Computerprogramm Excel eingegeben. Dort wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Ergebnisse wurden in entsprechenden Diagrammen dargestellt.

Die Daten des Degranulationsversuchs im β -Hex.-Verfahren wurden auf ihre statistische Signifikanz mittels des zweiseitigen Student-t-Test geprüft.

Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (probability value [p]) von $p < 0,005$ wurde als hochsignifikant, ein $p < 0,05$ als signifikant und ein $p > 0,5$ als nicht signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Darstellung der Häufigkeit auffälliger Schilddrüsenbefunde bei einem CU-Patientenkollektiv.

145 CU-Patienten der Urtikaria-Sprechstunde der Universitäts-Hautklinik Mainz wurden auf das Vorliegen eines auffälligen Schilddrüsenbefundes untersucht. 29% (n=42) der Urtikaria-Patienten zeigten Auffälligkeiten im Sonogramm wie z.B. eine abnorme Vergrößerung der Schilddrüse. Bei 17% (n=24) der Patienten wurde eine Hypo- oder Hyperthyreose diagnostiziert und 4% (n=6) litten unter einer Hashimoto Thyreoiditis. Bei 26% (n=37) der Urtikaria-Patienten wurden Autoantikörper (IgG) gegen Schilddrüsenbestandteile wie z.B. Thyreoglobulin oder Thyreoperoxidase nachgewiesen.

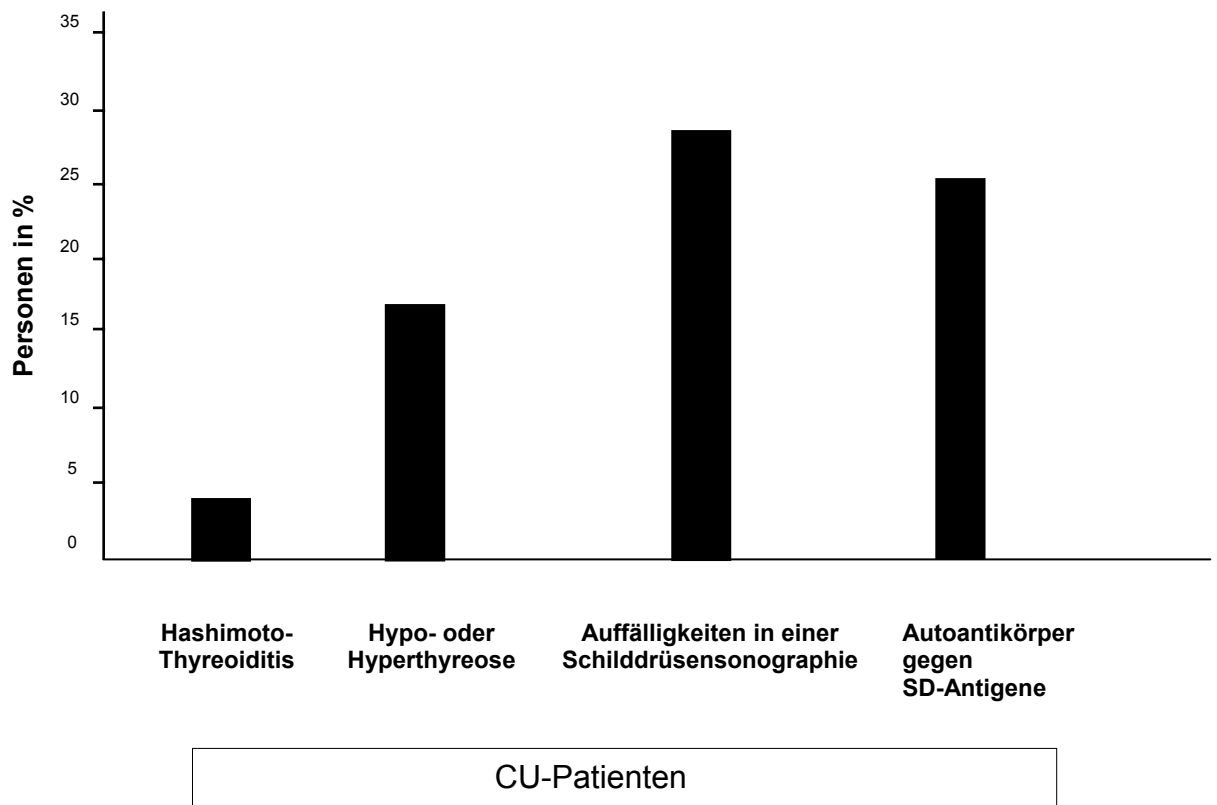


Abbildung 6: Vorkommen auffälliger SD-Befunde in einem CU-Patientenkollektiv.

Dargestellt ist die Häufigkeit an Personen (n= 145) in % innerhalb eines CU-Patientenkollektivs mit Hashimoto-Thyreoiditis, Hypo- oder Hyperthyreose, auffälligen Befunden in einer SD-Sonographie und Autoantikörper gegen SD-Bestandteile.

5.2 Entwicklung eines spezifischen site-directed IgE-anti-TPO ELISA zum Nachweis „autoallergischer“ anti-TPO-Antikörper.

Um zu prüfen, ob CU-Patienten IgE-Antikörper gegen SD-Autoantigene aufweisen, war es notwendig, Nachweisverfahren für solche IgE-Auto-Antikörper zu entwickeln, die mit hoher Spezifität und Sensitivität sowie geringem Aufwand durchzuführen sind.

Zunächst wurde versucht, den Nachweis mittels eines direkten ELISAs zu erbringen. Dabei wurde ein Serum einer bis dahin unbehandelten CU-Patientin mit Hashimoto-Thyreoiditis verwendet, das hohe Titer an auto-IgE- und auto-IgG-anti-TPO vermuten ließ. Bei unbehandeltem Serum (Extinktionswert $E = 0,077$) konnten keine IgE-anti-TPO-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 7). Aufgrund der Vermutung, dass IgG-anti-TPO-AK die IgE-anti-TPO-spezifische Immunreaktion unterdrückt haben könnten, wurden die Seren vorgereinigt und durch eine ProteinG-Säule von IgG-AK befreit. Mit dieser aufgereinigten IgE-Fraktion des Serums konnte der Nachweis von IgE-anti-TPO-AK erfolgreich im direkten ELISA-Verfahren erbracht werden. Der Extinktionswert lag mit $E = 0,481$ höher als der Wert des IgE-anti-TPO-Standards ($E = 0,325$). Jedoch sind der Aufwand für Zeit und Gerätschaften sehr hoch, so dass sich diese Methode nicht für ein Massenscreening oder den täglichen Einsatz in der Praxis eignet.

Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass es dem direkten ELISA-Verfahren an Sensitivität, möglicherweise auch an Spezifität, mangelt, IgE-anti-TPO-Antikörper auch in unbehandeltem Serum nachzuweisen. Aus diesem Grunde wurde versucht, ein neues capture ELISA-Verfahren zu entwickeln, das die notwendige Sensitivität und Spezifität aufweist, um IgE-anti-TPO-Antikörper auch in unbehandeltem Serum nachzuweisen. Dies ist, wie Abb. 7 zeigt, gelungen. Der Extinktionswert des unaufgereinigten Serums war in dem neuen Verfahren mit $E = 0,351$ nachweisbar hoch, in Höhe des Wertes für Standard IgE-anti-TPO ($E = 0,325$). Der Extinktionswert für die aufgereinigte IgE-Fraktion des Serums lag mit $E = 1,346$ sogar viermal höher als der Wert des Standard IgE-anti-TPO.

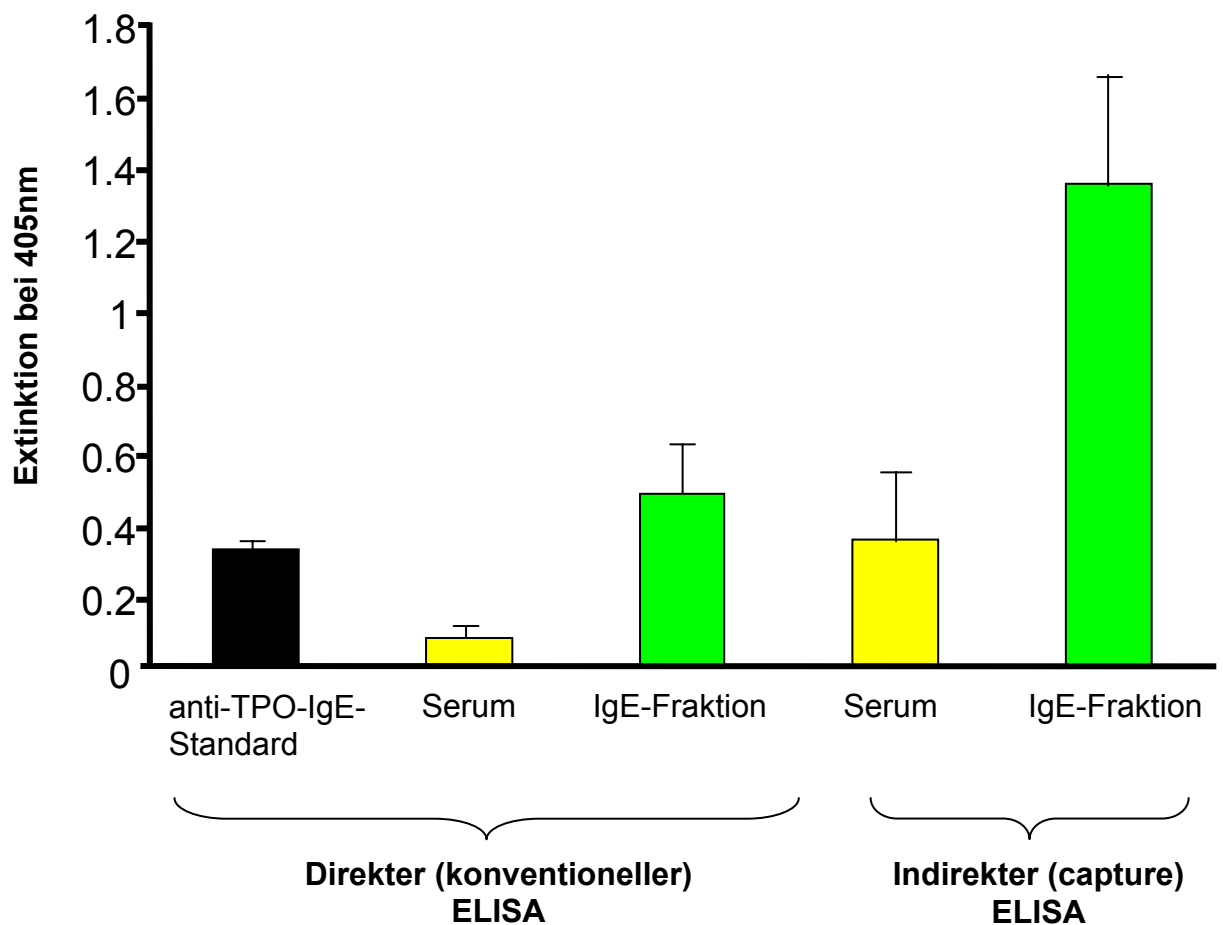


Abbildung 7: Messung der IgE-anti-TPO-Konzentration im Vergleich zwischen dem konventionellen ELISA und dem neu entwickelten site-directed-IgE-ELISA.

Dargestellt sind die Messergebnisse des IgE-anti-TPO-Nachweises im Patientenserum einerseits und in der gereinigten IgE-Fraktion des Patientenserums andererseits, durch zwei unterschiedliche Methoden im Vergleich. Gemessen wurde die Extinktion (405nm Wellenlänge). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis einer capture-IgE-anti-TPO-ELISA Platte im 3D-Säulen-Diagramm. Gemessen wurde die Extinktion bei 405nm (E 405). Es wurden insgesamt 300 Seren von CU-Patienten und 229 Seren von Kontrollpersonen auf das Vorhandensein und die Menge an IgE-anti-TPO-AK untersucht. In Abbildung 8 ist das Ergebnis der Messung von den CU-Patientenseren #155 bis #194, wie es auf der Mikrotiterplatte nach Abzug der Nullwerte zu sehen war, dreidimensional dargestellt. Zusätzlich sind routinemäßig auf der Platte die Standards, TPO-Standard (Sp2-Überstand) und „blanks“, zur Kontrolle mitgemessen worden. Deutlich zu sehen ist das Ergebnis der TPO-Standard-Verdünnungsreihe in absteigender Konzentration (1:1, 1:3 bis 1:2187), wonach die Eichkurve erstellt wurde, die zur Ermittlung der IgE-anti-TPO-AK-Konzentration in IU/ml diente.

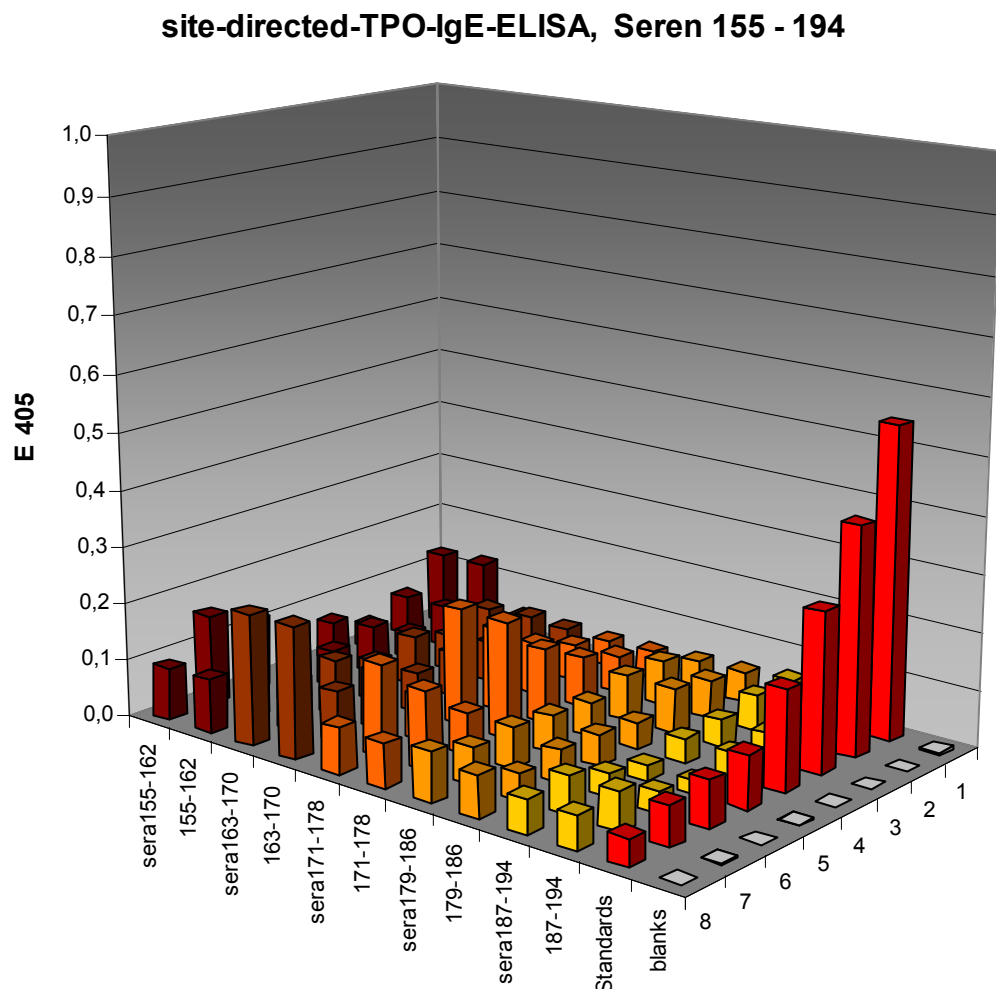


Abbildung 8: Messergebnis einer capture-IgE-anti-TPO-ELISA Platte im 3D-Diagramm.

Untersucht wurden die Seren #155 bis #194, der Standard (Sp2-IgE-Überstand als Verdünnungsreihe) und die Negativkontrollen dargestellt in „blanks“. Gemessen wurde „E“, die Extinktion bei 405nm Wellenlänge.

Um die Konzentration von IgE-anti-TPO im Serum von CU-Patienten in international gebräuchlichen Einheiten angeben zu können, wurde eine Eichkurve erstellt. Abbildung 9 zeigt grafisch die Konzentration an IgE-anti-TPO in Relation zu der gemessenen Extinktion. Aus diesen Werten wurde die potentiell wahrscheinlichste Trendkurve berechnet. Anhand dieser Eichkurve kann innerhalb des gemessenen Extinktionsbereiches die jeweilige Konzentration an IgE-anti-TPO in IU/ml ermittelt werden.

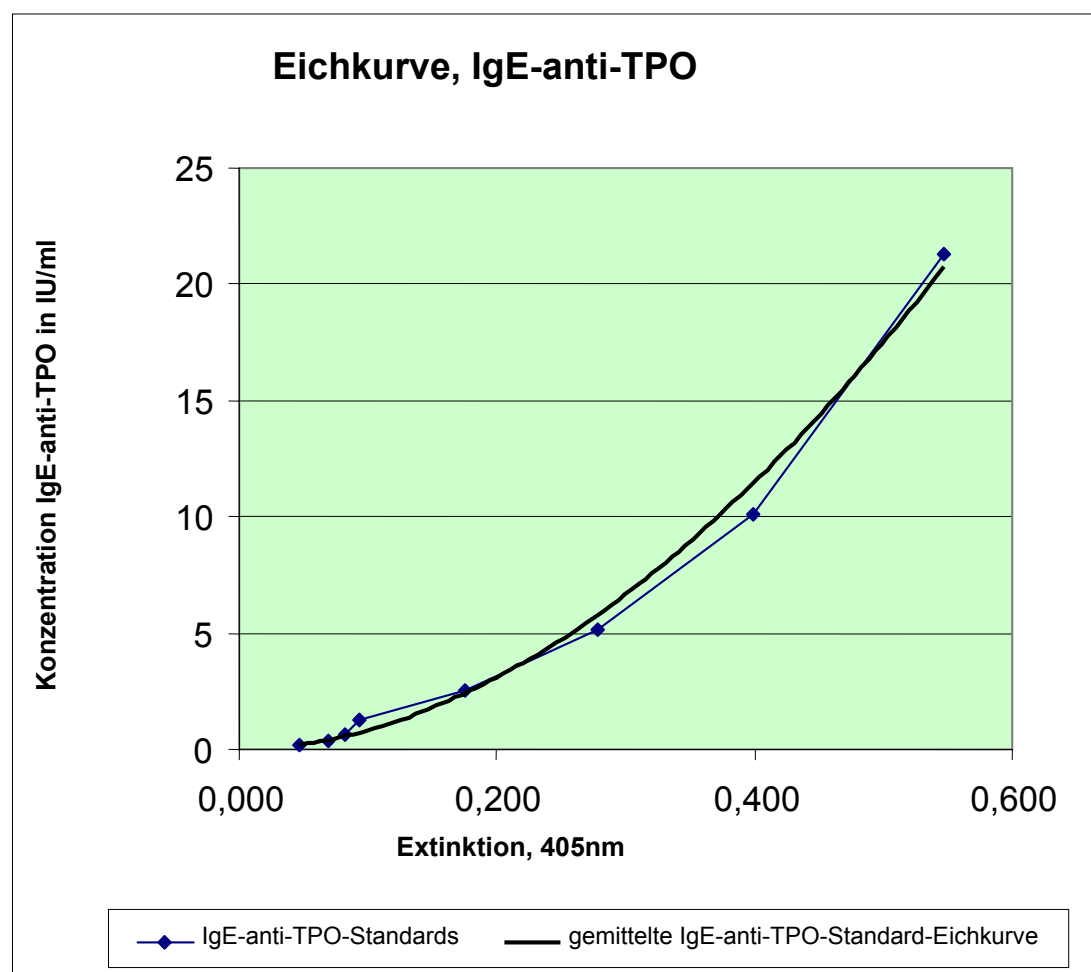


Abbildung 9: Eichkurve der IgE-anti-TPO-Standard-Verdünnungsreihe.

Die Abb. zeigt die Eichkurve der IgE-anti-TPO-Standard-Verdünnungsreihe und die rechnerisch-gemittelte Eichkurve. Dargestellt ist die Konzentration an anti-TPO-IgE (IU/ml) in Abhängigkeit von „E“, der Extinktion bei 405nm Wellenlänge. Benutzt wurden die Extinktionswerte des oben dargestellten capture-IgE-anti-TPO-ELISAs.

Im nächsten Schritt wurde der Frage nach der Spezifität der auto-IgE-anti-TPO-AK nachgegangen. Um die TPO-Spezifität der auto-IgE-AK im Serum zu überprüfen, wurden sie an *via* SDS-Page aufgetrennten Proteinen aus mikrosomalen Schilddrüsenextrakten getestet.

Die Spezifität des IgE-anti-TPO-AKs wurde durch den Western Blot nachgewiesen (Abb. 10). Es handelt sich hier um einen SDS-Page/Blot, bei dem mikrosomaler TPO-Extrakt (Bande A-C), und zur Kontrolle rekombinantes humanes TPO (Bande D), elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Der Nitrozellulose Blot wurde in Streifen geschnitten und anschließend mit verschiedenen Seren inkubiert. Zur Identifikation und als Marker lief rekombinantes TPO in einer separaten Gelspur mit. In Bande A wurde mit dem Serum einer CU-Patientin mit Hashimoto-Thyreoiditis inkubiert, welches schon bei der zuvor beschriebenen Entwicklung des neuen ELISAs eingesetzt wurde. Bande B wurde mit dem Serum einer gesunden Kontrollperson inkubiert und Bande C und D mit IgE-anti-TPO Standards.

TPO besitzt ein Molekulargewicht von 100kD. Im oberen Bereich von Streifen C erkennt man eine weitere Bande, bei der es sich um weitere Proteinbestandteile in der Suspension handeln könnte. Im Streifen B zeigt die Serum-IgE-Fraktion einer gesunden Kontrollperson keine Bande. Das heißt, dass kein IgE-anti-TPO im Serum enthalten ist. Im Gegensatz dazu zeigt Streifen A eine erkennbare Bande in Höhe des Molekulargewichtes des TPO (vgl. Bande C+ D), was eindeutig auf IgE-anti-TPO in der Serum-IgE-Fraktion der CU-Patientin schließen lässt.

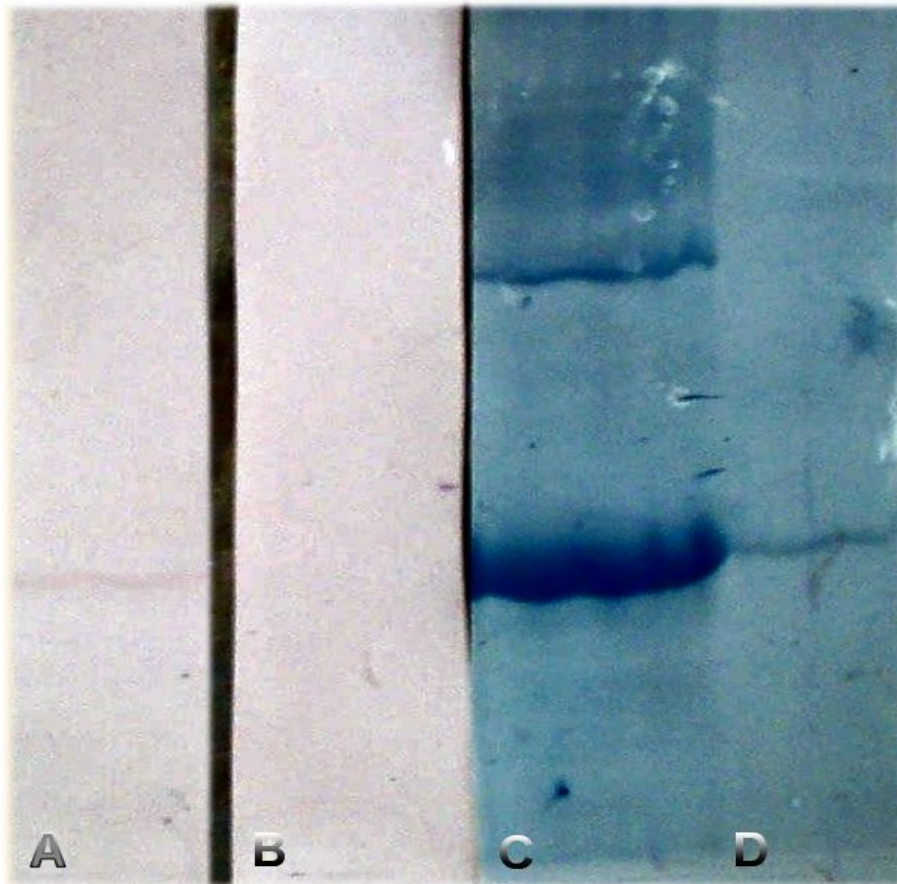


Abbildung 10: SDS-Page/Western Blot des Schilddrüsenproteins Thyreoidperoxidase (TPO).

Die Spezifität des IgE-anti-TPO-AKs und der Nachweis von IgE-anti-TPO-AK im Serum einer CU-Patientin wurde im Western (Immuno-) Blot nach Trennung mittels der SDS-Gelelektrophorese dargestellt. Abbildung 8 zeigt insgesamt 4 Banden nach Inkubation mit:

- A Serum-IgE-Fraktion von einer CU-Patientin mit Hashimoto-Thyreoiditis
- B Serum-IgE-Fraktion einer gesunden Kontrollperson
- C IgE-anti-TPO-Standard (Sp2-Überstand)
- D IgE-anti-TPO-Standard (Sp2-Überstand)

5.3 Ein Viertel aller untersuchten CU-Patienten zeigten erhöhte IgE-anti-TPO-AK im Serum.

Mit dem indirekten (capture) ELISA wurden die Seren von 300 CU-Patienten auf das Vorhandensein von IgE-anti-TPO untersucht. Ebenso wurden 229 Seren von Kontrollpersonen getestet, die laut eigenen Angaben weder unter einer Urtikaria noch unter einer Schilddrüsenerkrankung litten.

Abbildung 11 veranschaulicht die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Konzentrationen an IgE-anti-TPO (in IU/ml) in den Seren der CU-Patienten und der Kontrollpersonen.

Der höchste gemessene Wert an IgE-anti-TPO in Seren der Kontrollpersonen betrug 5,9 IU/ml. 27 Seren der CU-Patienten überschritten diesen Wert und wiesen einen höheren Titer an IgE-anti-TPO auf. Der Großteil (80% der Kontrollgruppe und 57% der CU-Patienten) der gemessenen Werte liegt unter 2 IU/ml. Nach dem Ausschlusskriterium von je 2,5% an beiden Rändern des Referenzbereiches der Kontrollgruppe, wurde ein vorläufiger oberer Grenzwert von 3.3 IU/ml für die nicht-pathologische IgE-anti-TPO-Konzentration festgelegt. Bei 25% aus der Gruppe der CU-Patienten wurde ein höherer Titer als 3,3 IU/ml gemessen. Den Maximalwert von 20 IU/ml, und damit den >6-fachen Wert der nicht-pathologischen Obergrenze, erreichte das Serum einer Patientin mit schwerer chronischer Urtikaria. Der Durchschnittswert an IgE-anti-TPO aus den Seren der Kontrollgruppe beträgt 0,8 IU/ml (gestrichelte Linie, Abb. 11). Der Durchschnittswert an IgE-anti-TPO aus den Seren der CU-Patienten beträgt 2,7 IU/ml (gestrichelte Linie, Abb. 11).

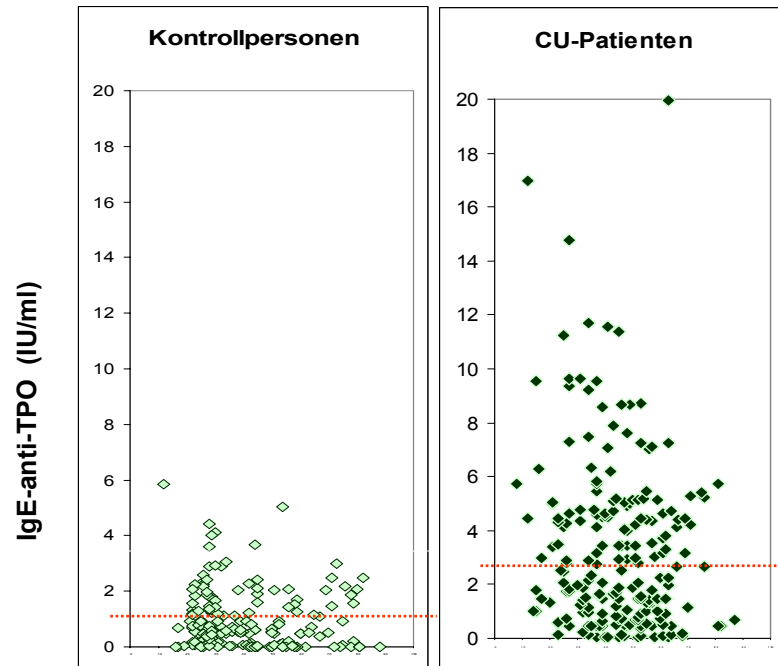


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung von CU-Patienten und Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der IgE-anti-TPO Konzentration in IU/ml.

Die gestrichelten Linien in den Darstellungen entsprechen den Durchschnittswerten für die IgE-anti-TPO-Konzentration der jeweiligen Personengruppe (Kontrollpersonen 0,8 IU/ml, CU-Patienten 2,7 IU/ml).

5.4 Die Wahrscheinlichkeit hoher IgE-anti-TPO Werte im Serum ist größer, wenn zugleich erhöhte IgG-anti-TPO Werte vorliegen.

Insgesamt 108 Seren von CU-Patienten wurden auf IgG-anti-TPO- und auf IgE-anti-TPO-Titer untersucht. Es wurde angenommen, dass Seren mit hohen Werten für IgG-anti-TPO auch entsprechend hohe Werte für IgE-anti-TPO aufweisen und dass ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Werten besteht (Abbildung 12A).

Von den 108 untersuchten Seren hatten 29 (27%) erhöhte Werte (>35 IU/ml) und 79 (73%) Werte unter 35 IU/ml für IgG-anti-TPO-AK. Von diesen 29 Seren mit erhöhten IgG-anti-TPO Werten hatten 14 Seren (48%) zugleich erhöhte Werte für IgE-anti-TPO-AK ($>3,3$ IU/ml). In der Gruppe der Seren mit normalen IgG-anti-TPO Werten, hatten dagegen nur 21 Seren (27%) erhöhte Werte für IgE-anti-TPO. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, erhöhte IgE-anti-TPO Werte zu haben, größer, wenn zugleich erhöhte IgG-anti-TPO Werte vorliegen.

Abbildung 12B zeigt die Korrelation zwischen den Werten für IgE-anti-TPO und der IgE-Gesamtkonzentration. Von den 187 untersuchten CU-Patientenseren hatten 55 (29%) eine erhöhte IgE-Gesamtkonzentration (>120 IU/ml) und 132 Seren (71%) Werte unter 120 IU/ml für Gesamt-IgE. Von den 55 Seren mit erhöhter Gesamt-IgE-Konzentration hatten 14 (25%) zugleich erhöhte Werte für IgE-anti-TPO ($>3,3$ IU/ml). In der Gruppe der Seren mit normalen Gesamt-IgE Werten hatten 34 (26%) erhöhte Werte für IgE-anti-TPO. Beide Gruppen (normale und erhöhte Gesamt-IgE Konzentration) unterscheiden sich somit nicht wesentlich voneinander, hinsichtlich des Auftretens hoher IgE-anti-TPO Werte. Bei jeweils $\frac{1}{4}$ der Seren aus beiden Gruppen wurden erhöhte Werte für IgE-anti-TPO gemessen.

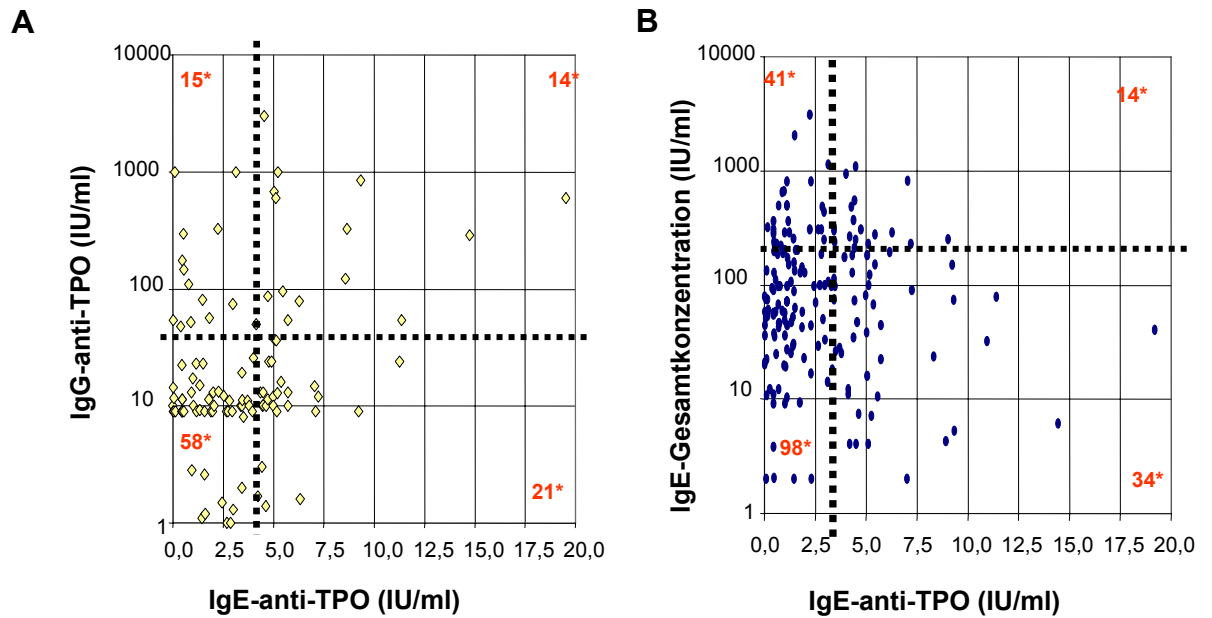


Abbildung 12: Korrelation der IgE-anti-TPO-Konzentration und der IgG-anti-TPO-Konzentration (A), bzw. der IgE-Gesamtkonzentration (B).

Die gestrichelten Linien markieren jeweils die Grenzwerte für IgE-anti-TPO (3,3 IU/ml), IgG-anti-TPO (35 IU/ml) und für die IgE-Gesamtkonzentration (120 IU/ml). * Anzahl der Seren.

Gesamtanzahl der Seren (A) n=108 und (B) n=187.

5.5 Mastzellen werden durch IgE-anti-TPO-AK aktiviert.

Die Funktionalität der IgE-anti-TPO-AK wurde durch Degranulationsversuche im β -Hexosaminidase-Verfahren getestet. Die Freisetzungsversuche wurden an RBL-2H3 Zellen durchgeführt, die den humanen Fc ϵ RI-Rezeptor exprimieren. Dass die Zellen den humanen-Fc ϵ RI-Rezeptor tatsächlich exprimierten, wurde in einer FACS-Analyse untersucht und bestätigt (klinisches Allergie Labor der Hautklinik Mainz). Abbildung 13 zeigt das Ergebnis des Degranulationsversuchs im β -Hexosaminidase-Verfahren. Eingesetzt wurden 3 Seren von Kontrollpersonen mit niedrigem IgE-anti-TPO-Titer (Con002 [1,1 IU/ml], Con004 [0,8 IU/ml] und Con023 [0,7 IU/ml]), 6 Seren von CU-Patienten mit einem Titer zwischen 4,5-20 IU/ml (CU298 [20 IU/ml], CU299 [17,1 IU/ml], CU202 [9,6 IU/ml], CU028 [7,3 IU/ml], CU088 [5,7 IU/ml], CU080 [4,5 IU/ml]), IgE-anti-TPO als Standard (22 IU/ml), h-TPO (250ng/ml), anti-human-Fc ϵ RI-AK (um die Funktionalität des Rezeptors zu testen) und einfaches Zellmedium zur Messung des „Spontanrelease“ („Veh.“).

Bei den Kontrollseren kam es nach h-TPO-Zugabe mit anschließender Färbung und Messung nicht zu einer Degranulation bzw. Freisetzung von β -Hexosaminidase, die auf einer IgE-anti-TPO-vermittelten Aktivierung beruht. Die geringe Freisetzung an β -Hexosaminidase bei den Kontrollseren liegt in der Höhe des Spontanrelease (5,5%) und der Freisetzung für h-TPO alleine (10,1%).

Bei den Seren der CU-Patienten CU080, CU088, CU028 und CU202 kam es nicht zu einer deutlichen β -Hex.-Freisetzung über den Wert hinaus, der für h-TPO alleine gemessen wurde (CU080=9,4%, CU088=12,1%, CU028=9,7%, CU202=12,3%). Die IgE-anti-TPO-hochpositiven Seren CU299 und CU298 zeigen eine deutlich erhöhte Freisetzung an β -Hexosaminidase, gegenüber den Werten des Spontanrelease und dem der h-TPO. Der spezifische Release, d.h. der Wert nach Abzug des Spontanrelaease bzw. des Wertes für h-TPO alleine, beträgt für CU298 8,6% und CU299 11,8%. Der absolute Release für 299 beträgt 21,9% und damit das vierfache des Spontanrelease.

Einen ähnlichen Wert wie CU 299 ergab die antigeninduzierte spezifische Freisetzung nach Stimulation mit dem IgE-anti-TPO Standard (23,6% absoluter Release), der in allen Versuchen als Standardkontrolle eingesetzt wurde.

Die Ergebnisse deuten klar auf eine Funktionalität und mögliche pathogenetische Relevanz der IgE-anti-TPO-AK hin, die zumindest *ex vivo* imstande sind, Mastzellen zu aktivieren.

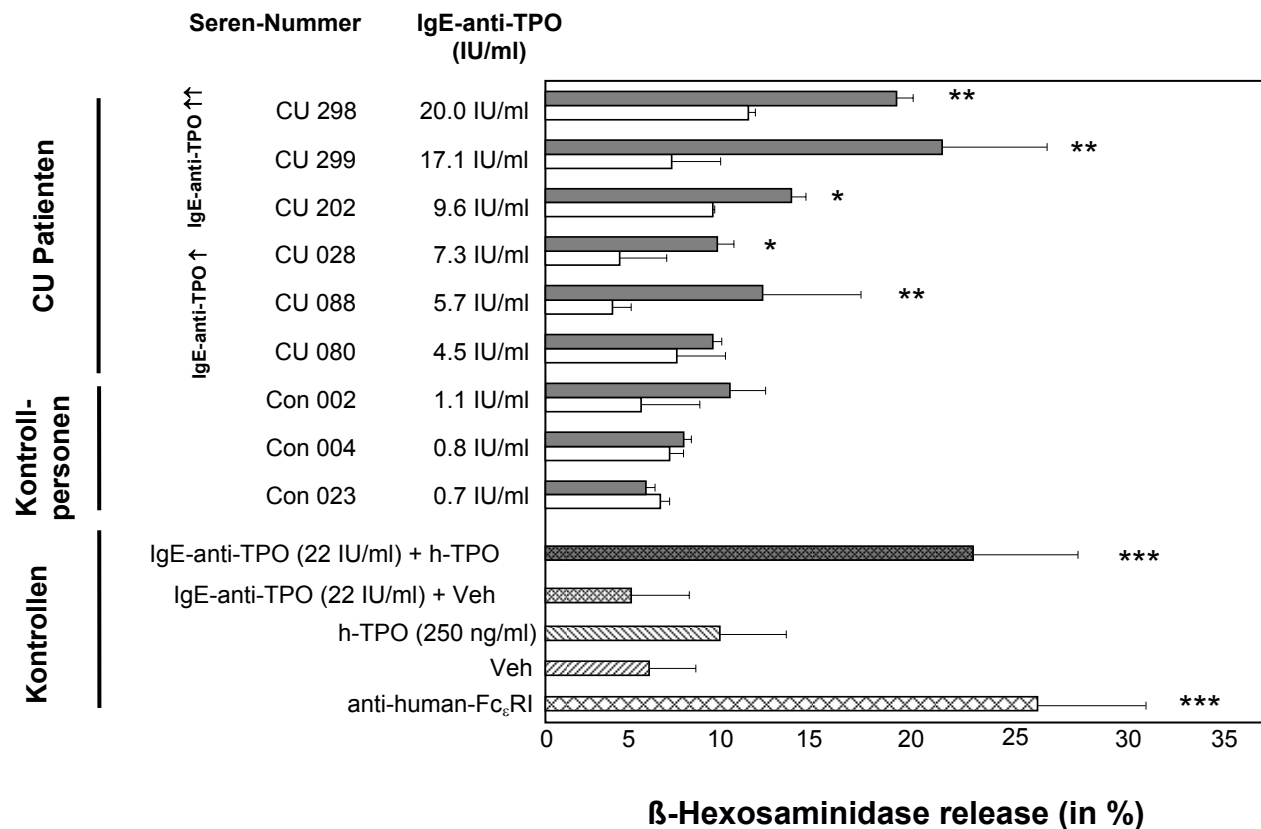


Abbildung 13: Ergebnis eines β-Hexosaminidase-release-assay an RBL-2H3-Zellen.

In dem Säulendiagramm ist die Freisetzung des Enzyms β-Hexosaminidase in %, nach der Inkubation mit verschiedenen Seren/ Suspensionen alleine (weiße Säulen) und nach Inkubation und Stimulation mit h-TPO (graue Säulen), dargestellt. Gemessen wurden 6 CU-Patientenseren (IgE-anti-TPO zwischen 4,5 und 20 IU/ml), 3 Kontrollseren (IgE-anti-TPO zwischen 0,7 und 1,1 IU/ml) und verschiedene Kontrollen/Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

p-value: *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

5.6 Die Verminderung von SD-Autoantikörpern im Serum in Folge einer Thyreodektomie kann zu einer Verminderung urtikarieller Beschwerden führen.

Es wurde eine CU-Patientin mit einer Autoimmunerkrankung der SD (Hashimoto Thyreoiditis) untersucht, die im Rahmen ihrer Therapie bereit war, nach einer Thyreodektomie Blutproben in den folgenden Zeitabständen abzugeben: 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen nach Thyreodektomie. Die Patientin wurde gebeten, für die Zeit nach der Thyreodektomie ein Tagebuch zu führen und im zeitlichen Verlauf die Quaddelbildung und den Juckreizes zu dokumentieren. Das Blut wurde auf die IgG-anti-TPO- und IgE-anti-TPO-Serumkonzentrationen hin untersucht. Die Patientin besaß hohe Ausgangswerte für IgG-anti-TPO (747 IU/ml) und IgE-anti-TPO (59 IU/ml) unmittelbar vor der Operation (OP).

Abbildung 14A veranschaulicht, dass die IgG-anti-TPO-Konzentration nach Thyreodektomie rasch abnahm. Bereits in den ersten zwei Wochen sank der Titer auf 410 IU/ml. In den folgenden Wochen verminderte sich die Konzentration weiter und sank in der 10. Woche bis auf 186 IU/ml. Das entspricht einer Abnahme um 561 IU/ml (75% des Ausgangswertes).

In Abbildung 14B ist die Veränderung der IgE-anti-TPO-Konzentration über die Dauer der 10 Wochen nach Thyreodektomie dargestellt. Der Titer sank rasch bis zur 4. Woche *post* OP auf 80% des Ausgangswertes (47 IU/ml). In den weiteren Wochen nahm der Titer stetig ab, bis zu einem Wert von 53% des Ausgangswertes (31 IU/ml) in der 10. Woche *post* OP.

Die Veränderungen der urtikariellen Beschwerden, zum einen die Quaddelbildung und zum anderen der Juckreiz, sind in Abbildung 14C dargestellt. Zum Zeitpunkt der Thyreodektomie gab die Patientin an, etwa 100 Quaddeln/ Tag zählen zu können. Die Stärke des Juckreizes wurde in einer Skala von 1-3 mit drei angegeben. In der Zeit nach der Entfernung der SD besserten sich die Symptome rasch. Bis zur 4. Woche *post* OP nahm die Anzahl der täglich auftretenden Quaddeln stark ab, auf etwa 10/ Tag. Der Juckreiz wurde mit ca. 0,5 auf deutlich weniger als Eins beziffert. Bis zur 10. Woche verbesserten sich die Symptome derart zum Positiven, dass nur noch wenige vereinzelte Quaddeln/ Tag existent waren und der Juckreiz ganz verschwand.

Die Laborbefunde der IgG-anti-TPO- und der IgE-anti-TPO-Konzentrationen, zusammen mit der Dokumentation der Veränderung der urtikariellen Beschwerden, lassen den Schluss zu, dass die Thyreodektomie zur Besserung der Symptome und damit gleichzeitig zur Verminderung des Leidens der Patientin geführt hat.

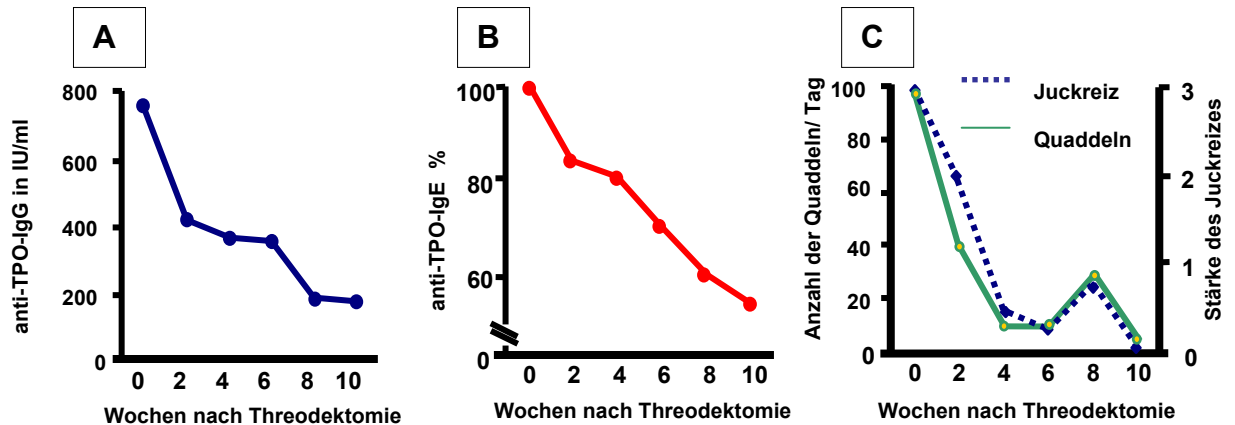


Abbildung 14: Darstellung der Befundergebnisse einer CU-Patientin nach Thyreodektomie über einen Zeitraum von 10 Wochen.

A Verlauf der IgG-anti-TPO-Serumkonzentration nach Thyreodektomie.

Dargestellt ist die Veränderung der IgG-anti-TPO-Serumkonzentration (in IU/ml) in Abhängigkeit von der Zeit nach Thyreodektomie (10 Wochen). Gemessen nach jeweils 2 Wochen.

B Verlauf der IgE-anti-TPO-Serumkonzentration nach Thyreodektomie.

Dargestellt ist die Veränderung der IgE-anti-TPO-Serumkonzentration (in %) in Abhängigkeit von der Zeit nach Thyreodektomie (10 Wochen). Gemessen nach jeweils 2 Wochen.

C Verlauf urtikarieller Beschwerden nach Thyreodektomie.

Dargestellt ist die Veränderung der urtikariellen Beschwerden, Juckreiz und Quaddelbildung, über die Dauer von 10 Wochen (Zeit nach Thyreodektomie). Gemessen nach jeweils 2 Wochen. Die durchgezogene Kurve gibt den Verlauf der Quaddelanzahl pro Tag wieder, von 0-100. Die gestrichelte Kurve beschreibt die Stärke des Juckreizes, gemessen nach subjektivem Befinden der Patientin von 1-3.

6. Diskussion

Die chronische Urtikaria, ein „Mysterium“, kann viele Ursachen haben, wie z.B. eine Intoleranz gegenüber bestimmte „Lebensmittel“ (-zusätze), eine Medikamentenunverträglichkeit oder verschiedene innere Erkrankungen (Pigatto and Valsecchi, 2000). Auch heute noch wird bei vielen Patienten mit chronischer Urtikaria die Diagnose einer chronischen idiopathischen Urtikaria gestellt, was bedeutet, dass keine zugrunde liegende Ursache gefunden werden konnte (Fox, 2001).

Die chronische Urtikaria (CU) stellt für nahezu alle Betroffenen eine quälende und die Lebensqualität einschränkende Krankheit dar (O'Donnell *et al*, 1997). Unumstritten ist die Beteiligung der Mastzellen, als so genannte Schlüsselzellen, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese der (chronischen) Urtikaria einnehmen. Welche Rolle Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, wie die Hashimoto Thyreoiditis oder der Morbus Basedow, in der Ätiopathogenese der chronischen Urtikaria spielen, ist bisher unzureichend geklärt. Wie in mehreren Studien beschrieben, schwankt das Vorkommen von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (SD) in einem untersuchten Patientengut mit chronischer Urtikaria zwischen 12 und 50%, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe 5-9% (Leznoff *et al*, 1983; Napoli und Freeman, 2001; Zauli *et al*, 2001; Kullavanijaya *et al*, 2002; Bakos und Hillander, 2003; Greaves, 2003).

Insbesondere ist bisher nicht ausreichend geklärt, ob Auto-Antikörper (Auto-AK) in der Ätiopathogenese der Urtikaria eine Rolle spielen, und wenn ja, welcher Mechanismus hierbei zu Grunde liegt.

Dass eine antikörpervermittelte Reaktion in der Pathogenese der chronischen idiopathischen Urtikaria verantwortlich für die Mastzellaktivierung und die darauf folgende Quaddelbildung, Rötung und Juckreiz sein kann, wurde erstmals von den Autoren Rorsman und Gruber beschrieben. Sie konnten verschiedene Auto-AK im Serum von CU-Patienten nachweisen, die für urtikarielle Reaktionen verantwortlich gemacht werden konnten (Rorsman, 1962; Gruber *et al*, 1988). Dieser Sachverhalt gilt heute als bewiesen. Doch weiterhin bleiben die Fragen offen, welche Klassen von AK beteiligt sind, mit welcher Spezifität sie reagieren und ob eine Autoimmunerkrankung zugrunde liegen könnte.

Erstmals 1993 von Hide und Mitarbeitern (Hide *et al*, 1993) beschrieben, 1996 von der Arbeitsgruppe um Niimi (Niimi *et al*, 1996) bestätigt und heute unumstritten ist die Existenz von IgG-Auto-Antikörpern, die gegen den hochaffinen IgE-FcεRI-Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gerichtet sind. Man testete das Serum von CU-Patienten und die gereinigte IgG-Fraktion aus dem Serum von CU-Patienten an Mastzellen und Basophilen von gesunden Probanden. Es kam zur Freisetzung von Histamin, welche inhibiert werden konnte, indem das Serum bzw. die IgG-Fraktion mit rekombinantem FcεRIα vorinkubiert wurde. FcεRIα ist die α-Untereinheit des hochaffinen IgE-Rezeptors, der für die Bindung des IgE-Antikörpers verantwortlich ist. In einigen Fällen konnte die Aktivierung der Mastzellen durch Vorinkubation mit IgE inhibiert werden, was auf das Vorhandensein von auto-IgG-anti-IgE schließen ließ. In dem Autologen Serum Test, bei dem man eigenes Serum intradermal injiziert bekam, reagierten die Probanden mit urtikariellen Hautreaktionen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass auto-IgG-anti-FcεRI und auto-IgG-anti-IgE als Ursache für urtikarielle Hautreaktionen in Frage kam (Hide *et al*, 1993; Niimi *et al*, 1996).

Diese Ergebnisse wurden von unabhängigen Gruppen in der Literatur betätigt. Das Vorkommen von anti-FcεRI-Auto-AK im Serum von CU-Patienten schwankt zwischen 35-55% (Fiebiger *et al*, 1995; Tong *et al*, 1997; Zweiman *et al*, 1998).

Bereits 1983 vermuteten Leznoff *et al*. (Leznoff *et al*, 1983) einen Zusammenhang zwischen der CIU und einer Schilddrüsen-Autoimmunerkrankung. Dies basierte auf der Entdeckung von mikrosomalen Thyreoid-Antikörpern in 12,1% bzw. 17 von 140 untersuchten Patientenseren. 8 der 17 Patienten hatten eine Schilddrüsendysfunktion. Im Vergleich dazu wurde in einer Kontrollgruppe von 477 Personen in nur 27 Fällen (5,6%) AK gegen mikrosomale SD-Bestandteile gefunden. Die 8 Patienten mit CIU, SD-Dysfunktion und mikrosomalen Thyreoid-Antikörpern wurden dann über einen Zeitraum von 2 Monaten mit Levothyroxin behandelt. Bei 3 Patienten kam es zur vollständigen Remission und bei weiteren 3 zur Besserung der urtikariellen Beschwerden. Der Zustand der anderen 2 Patienten war nach der Behandlung unverändert. In einer weiteren Studie von Rumbyrt und Mitarbeitern (Rumbyrt *et al*, 1995) wurden 10 euthyreote Patienten mit refraktorischen Quaddeln einer Behandlung mit Thyroxin unterzogen. Bei 7 Patienten mit erhöhten anti-Thyreoid-AK kam es zu einer Besserung der

urtikariellen Symptome innerhalb von 4 Wochen. Nach Einstellung der Behandlung berichteten 5 Patienten über wiederkehrende Beschwerden, die sich nach Wiederaufnahme der Thyroxin-Behandlung wieder besserten. 3 Patienten ohne erhöhte anti-Thyreoid-AK reagierten nicht auf die Thyroxin Behandlung. Ein weiteres Fallbeispiel liefert die Arbeitsgruppe um Koh (Koh *et al*, 2000). Ein euthyreoter CU-Patient mit erhöhten anti-Thyreoid-AK wurde mit Thyroxin behandelt. Es kam zur Remission der urtikariellen Beschwerden bei gleichzeitig unveränderten Werten an anti-Thyreoid-AK. Ob eine Behandlung der CU-Patienten, die hohe Werte an anti-Thyreoid-AK und/ oder eine SD-Dysfunktion haben, mit Thyroxin sinnvoll erscheint ist jedoch bisher nicht in kontrollierten klinischen Studien untersucht worden und bleibt deshalb unklar.

Die Entdeckungen von SD-Auto-AK im Serum von CU Patienten, und der mögliche Zusammenhang mit dem Auftreten von urtikariellen Symptomen, wurden von weiteren unabhängigen Studien bestätigt (Ryhal *et al*, 2001; Zauli *et al*, 2001; Greaves, 2003; Leznoff *et al*, 1989; Turktaş *et al*, 1997). Das Auftreten von SD-Auto-AK im Serum von CU-Patienten schwankt zwischen 20 und 29%. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen wird auf die unterschiedliche Sensitivität und dadurch bedingt die mangelnde Vergleichbarkeit der Methoden, zum Nachweis dieser spezifischen Antikörper, zurückgeführt (Zauli *et al*, 2002).

Greaves berichtet über Vorkommen von Autoimmunerkrankungen bei CIU-Patienten und in 27% der Fälle sind Autoantikörper gegen SD-Bestandteile nachgewiesen worden. Dennoch sieht er es bislang als unbewiesen an, dass anti-thyreoidale-Auto-AK pathogen (krankheitserregend), im Zusammenhang mit CU, wirken (Greaves, 2003).

Ob und inwieweit anti-TG-AK eine Rolle in der Ätiopathogenese der CIU spielen wurde in der vorliegenden Arbeit anfänglich mit verfolgt, aber nicht eingehend untersucht. Dies soll Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Wir verfolgten in dieser Untersuchung die Theorie einer Auto-IgE-vermittelten Aktivierung der Effektorzellen der Nesselsucht (Mastzellen und Basophile). Unsere Hypothese war, dass solche Auto-AK mit dem Fc-Teil an die Effektorzellen binden, nachfolgend das endogene Antigen als Allergen erkennen und so IgE-Rezeptoren quervernetzen, im Sinne einer „Autoallergie“. Um diese Theorie zu prüfen, haben

wir zunächst den hier vorgestellten capture-ELISA für IgE-anti-TPO entwickelt, der eine 3- bis 4-fach höhere Sensitivität als ein konventioneller ELISA besitzt. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten wir bei einem Teil der untersuchten CU-Patienten „Autoallergische“ Antikörper (IgE-anti-TPO) nachweisen. In einem zweiten Schritt wurde das Serum von CU-Patienten zunächst über eine ProteinG-Säule gereinigt, um alle IgG-AK zu eliminieren. Tatsächlich kam es auch ohne IgG-AK durch das Serum der CU-Patienten (aufgereinigte IgE-Fraktion) zur Degranulation der Effektorzellen, die somit eindeutig nicht auf einer IgG-vermittelten Reaktion basieren konnte. Inwieweit andere Immunglobuline und Komplementfaktoren eine Rolle spielen wurde nicht geklärt und ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

In den 80er Jahren wurden mikrosomale Thyreoid-Antikörper entweder durch die Immunfluoreszenz- oder durch die Hämagglutinations-Methode nachgewiesen, die nicht ausreichend sensitiv waren. In einer Studie beschrieben Lindberg *et al.* (Lindberg *et al.*, 2001) den Radioimmuno Assay als den einzigen Test, Auto-AK in der Autoimmunthyreoiditis zu identifizieren (Zauli *et al.*, 2002). Es ist bisher nicht gelungen eine akzeptable Methode *in vitro*, zum Nachweis und zur Diagnose einer chronischen Autoimmun-Urtikaria, zu entwickeln. Bisheriger „Goldstandard“ als Testmethode zum Nachweis einer chronischen Autoimmun-Urtikaria ist die Messung der Mediator-(Histamin) Freisetzung nach Stimulation von Mastzellen oder Basophilen. Alternativ könnten auch RBL-Zellen (rat basophil leukaemia), die transfiziert wurden und den h-FcεRI-Rezeptor exprimieren, zu Freisetzungsversuchen benutzt werden. *In vivo* wird zur Diagnose einer chronischen Autoimmun-Urtikaria zunehmend der Autologe-Serum-Test angewendet. (Greaves, 2003).

Die Gruppe um Bar-Sela *et al.* fanden bei einem Patienten mit CIU IgE-Antikörper gegen die TPO. Darauf aufbauend hat man die These aufgestellt, dass IgE-anti-TPO-AK mit einer Peroxidase z.B. aus dem Essen, quervernetzt werden und eine Urtikaria auslösen könnte (Bar-Sela *et al.*, 1999). In einer Studie von Tedeschi *et al.* wurden 23 CIU-Patienten, die positiv für IgG-anti-TPO getestet worden waren, auf IgE-anti-TPO untersucht. Bei keinem dieser Patienten wurden IgE-anti-TPO-Antikörper nachgewiesen (Tedeschi *et al.*, 2001).

Es gibt mehrere Gründe dafür, warum es schwierig ist, IgE-anti-TPO im Serum nachzuweisen. Die Gesamt-IgE Konzentration im Serum ist, verglichen mit der Gesamt-IgG Konzentration, sehr gering. Gesunde Personen haben einen IgE-Titer von etwa 0,5-3µg/l und einen IgG-Titer von etwa 50g/l. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:50.000.000. Bei Allergikern, d.h. Patienten mit hohen IgE-Titern, beträgt die Relation in etwa 1:10.000. Zudem sind IgE-AK, mit 2-3 Tagen Lebensdauer, sehr kurzlebig, verglichen mit dem IgG-AK (bis zu 4 Wochen). Hieraus ergibt sich die Schwierigkeit, dass die zahlenmäßig überlegenen IgG-AK mit den IgE-AK derselben Spezifität um das gleiche Antigen konkurrieren können. Zur klassen-spezifischen Detektion von anti-TPO-Auto-AK ist es daher notwendig, die IgE-AK von den Immunglobulinen anderer Klassen zu isolieren und zu konzentrieren.

Neben der Detektion der Auto-IgE-anti-TPO gibt es auch Schwierigkeiten, die Funktionalität der AK durch Freisetzungsversuche zu testen. Man kann z.B. davon ausgehen, dass ein Teil des Serum-IgE-anti-TPO mit dem TPO (internes Antigen) bereits beladen ist. Das heißt, die Bindungsstelle für das Antigen ist bereits besetzt, so dass es durch eine Zugabe des Antigens im Versuch weder zu einer erneuten Antigenbindung noch zu einer Quervernetzung kommen kann.

Durch den neu entwickelten site-directed-TPO-ELISA wurden in Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, 300 CU-Patientenseren und 229 Seren von Kontrollpersonen auf spezifisches IgE-anti-TPO untersucht. Dabei wurde durch das modifizierte ELISA-Verfahren die Sensitivität gegenüber dem konventionellen ELISA deutlich verbessert, indem der aktivierte Primärantikörper nur über den Fc-Teil und nicht zufällig an die Platte gebunden wird. Der TPO bindende IgE-AK kann über ein sekundäres Antigen und einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. So konnte in dieser Arbeit der deutlich verbesserte capture-ELISA dargestellt werden, dessen Sensitivität drei bis vier mal höher liegt, als die des konventionellen ELISA. Anschließend wurden die IgE-anti-TPO hoch positiven Seren in Freisetzungs-Versuchen (β-Hexosaminidase-Release Assay) getestet, was zu deutlichen Freisetzungsergebnissen geführt hat. Zwei der Seren (>10IU/ml) reagierten mit einem spezifischen Release von 8,6% bzw. 11,8%.

Inwieweit Komplementfaktoren bei der Histaminfreisetzung eine Rolle spielen wurde bisher nicht näher berücksichtigt und sollte in der Zukunft noch untersucht werden. Es gibt Untersuchungen an Seren mit auto-IgG-anti-FcεRI, die Komplementfaktoren enthalten und mit dekomplementiertem Serum. Das Ergebnis war, dass das Serum mit Komplementfaktoren Histamin freisetzte, im Gegensatz zu dem dekomplementierten Serum. Man schlussfolgerte, dass Komplementfaktoren an der Aktivierung der Effektorzellen maßgeblich beteiligt waren (Greaves, 2003).

Patienten mit chronischer Urtikaria setzen sowohl spontan, als auch nach entsprechender Stimulation mit degranulierenden Wirkstoffen (Compound 48/80 oder Codein) mehr Histamin frei als Kontrollpersonen (Armenaka und Rosenstreich, 1992; Holgate, 1996). Diesbezüglich gibt es allerdings auch widersprüchliche Angaben in der Literatur, die besagen, dass die Histaminfreisetzung aus Basophilen von Patienten mit chronischer Urtikaria gegenüber denen der Kontrollpersonen deutlich verringert ist (Greaves *et al*, 1974; Kern und Lichtenstein, 1976). Dies könnte auf eine „Erschöpfung“ der Histaminspeicher im Rahmen der chronischen Erkrankung oder auf eine Desensibilisierung infolge repetitiver Antigenexposition zurückzuführen sein (Holgate, 1996).

Die Spezifität der IgE-auto-AK für TPO wurde durch die SDS-Gelelektrophorese und den Western Blot (Immunoblot) nachgewiesen. Abbildung 10 zeigt deutlich eine Bande in der Serum-IgE-Fraktion von einer Patientin mit Hashimoto Thyreoiditis und CU auf Höhe des Molekulargewichts von TPO. Doch das Vorhandensein von auto-IgE-anti-TPO sagt noch nichts über die Funktionalität und die klinische Relevanz aus.

Sowohl der Zusammenhang zwischen dem IgE-anti-TPO-Titer und dem IgG-anti-TPO-Titer als auch der Zusammenhang zwischen dem IgE-anti-TPO-Titer und der IgE-Gesamtkonzentration, wurden in dieser Arbeit untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es wahrscheinlicher ist, hohe IgE-anti-TPO-AK zu haben, wenn zugleich hohe IgG-anti-TPO-AK vorliegen. Eine Korrelation zwischen der IgE-Gesamtkonzentration und der IgE-anti-TPO Konzentration konnte nicht festgestellt werden.

Die Frage, ob Auto-IgE-anti-TPO an Mastzellen binden, durch TPO stimuliert werden und dadurch eine Degranulation auslösen, konnte mit Hilfe des „ β -Hexosaminidase release“ Verfahrens geklärt werden. Erste Hinweise auf die Funktionalität von IgE-anti-TPO-Auto-AK gab eine Untersuchung an einer CU-Patientin mit Hashimoto Thyreoiditis, starken urtikariellen Beschwerden (Quaddelbildung und Juckreiz) und hohen Titern an IgG- und IgE-anti-TPO. Nach der operativen Entfernung der Schilddrüse sanken die hohen Konzentrationen beider AK-Klassen sehr rasch und auch die anfänglich starken Beschwerden besserten sich und verschwanden fast vollständig. Das Ergebnis der weiterführenden Untersuchung zeigte, dass IgE-anti-TPO-AK aus Seren von CU-Patienten, nach Aufreinigung und Stimulierung mit mikrosomalem TPO, Effektorzellen (RBL-2H3-Zellen) zur Degranulation bringen konnten. Dies wurde im β -Hex.-Assay für Seren $>10\text{IU/ml}$ IgE-anti-TPO mit einer spezifischen Freisetzung von $>12\%$ gemessen.

Alle Seren wurden zu Versuchszwecken verdünnt (1:25), weil unverdünntes Serum schon alleine die jeweiligen Effektorzellen zur Degranulation bringen kann. Ein Grund dafür könnte das Vorhandensein von aktiven Komplementfaktoren sein. Im unverdünnten Serum könnte auch eine schon ausreichend hohe Konzentration an TPO vorliegen, die die Effektorzellen ohne weitere Antigenzugabe degranulieren lässt. Die Möglichkeit, dass eventuell andere Antikörper bei der Degranulation eine Rolle spielen könnten, kann nicht ganz ausgeschlossen und muss in zukünftigen Arbeiten noch untersucht werden.

Ob CU-Patienten mit einer Autoimmunerkrankung der SD anders behandelt werden sollten als solche ohne, und wenn mit welchen Mitteln, ist bisher umstritten. In einigen Fällen kommt es zu einer Besserung der CU nach Behandlung mit L-Thyroxin (Zauli *et al*, 2002; Rumbyrt *et al*, 1995; Koh *et al*, 2000). Es gibt Meinungen, nach denen CU-Patienten mit einer manifesten oder einer subklinischen Hypothyreose immer, z.B. mit L-Thyroxin, behandelt werden sollten, was in einigen Fällen zu einer Remission der CU führt (Zauli *et al*, 2002). Einer anderen Meinung zur Folge tritt die CIU gehäuft mit einer

Autoimmunerkrankung der SD auf, aber es gäbe keine Beweise dafür, dass die Behandlung der SD-Dysfunktion den Verlauf der CIU beeinflussen würde (Greaves, 2003).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse beschreiben eine neue Methode, IgE-anti-TPO-AK im Serum von (CU-) Patienten effektiv nachzuweisen. Die Schwierigkeit der mangelnden Sensitivität wurde ausgeräumt. Damit ist es möglich, die Seren von CU-Patienten auf spezifische Auto-IgE-AK zu testen und als mögliche Ursache nachzuweisen. 25% der untersuchten CU-Patienten besaßen einen IgE-anti-TPO-Titer von $>3,3\text{IU/ml}$. Die Funktionalität, der IgE-anti-TPO-AK wurde im nächsten Schritt durch Stimulationsversuche an Ratten-Basophilen (RBL) untersucht. Nach Inkubation und Stimulation kam es in bestimmten Fällen (Seren mit hohen IgE-anti-TPO-Titer) zur Degranulation und spezifischen Freisetzung an Mediatorstoffen durch die Effektorzelle, was klinisch zu urtikariellen Hautreaktionen führen könnte.

Das klinische Beispiel einer CU-Patientin, mit Hashimoto-Thyreoiditis und sehr hohen IgE-anti-TPO- und IgG-anti-TPO-Titern, weist auf die mögliche pathologische Relevanz solcher anti-TPO-Auto-AK hin. Denn nach Thyreodektomie, und damit Beseitigung/ Reduzierung des endogenen Auto-Antigens und begleitendem Abfall der IgE-anti-TPO Serumkonzentration, kam es rasch (innerhalb von 10 Wochen) zur fast vollständigen Remission der urtikariellen Beschwerden wie Quaddelbildung und Juckreiz.

Als Schlussfolgerung sollten CIU-Patienten, die in Verdacht stehen, eine Autoimmunerkrankung der SD bzw. eine SD-Dysfunktion zu haben, nach möglichen IgE-anti-TPO-AK untersucht werden. Denn darin könnte die Ursache der Erkrankung liegen und die chronische Urtikaria wäre nicht länger eine „idiopathische“, sondern wäre auf einen „autoallergischen“ Prozess zurückzuführen.

7. Zusammenfassung

Seit den 80er Jahren wird zunehmend über den Zusammenhang zwischen einer chronischen Urtikaria und Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (SD) diskutiert. Wir hatten Grund zur Annahme, dass CU-Patienten neben IgG-Autoantikörpern (AAK) auch AAK der Klasse IgE gegen SD-Antigene wie die Thyreoperoxidase (TPO) exprimieren und haben postuliert, dass bei IgE-anti-SD-positiven CU-Patienten über den Mechanismus „**Autoallergie**“, Mastzellen durch SD-Antigene degranuliert werden können und so urtikarielle Symptome auslösen. In dieser Arbeit wurden deshalb 300 CU-Patientenseren auf „autoallergische“ IgE-AK untersucht. 25% der Patienten hatten erhöhte IgE-anti-TPO Titer von mehr als 3,3 IU/ml. Zum Nachweis der IgE-anti-TPO-AAK im Serum wurde ein neuer, modifizierter capture ELISA entwickelt und vorgestellt, dessen Sensitivität um das drei- bis vierfache höher ist, als die eines konventionellen ELISAs. Die Funktionalität von IgE-anti-TPO-AAK wurde in Stimulationsversuchen durch die Messung von β -Hexosaminidase erbracht. Seren mit einem IgE-anti-TPO-Titer >10 IU/ml wiesen eine spezifische Freisetzung von bis zu 11,8% auf. Die Annahme einer „Autoallergie“ wird weiterhin durch ein klinisches Fallbeispiel erhärtet. Einer CU-Patientin mit Hashimoto-Thyreoiditis, sehr hohen Titern an anti-TPO-AAK (IgG und IgE) und starker Urtikaria-Symptomatik wurde operativ die SD entfernt. Innerhalb von 10 Wochen, *post-operativ*, kam es sowohl zu einer raschen Verminderung der AAK-Konzentrationen, als auch zur fast vollständigen Remission der urtikariellen Beschwerden wie Quaddelbildung und Juckreiz. Die Erkenntnisse dieser Arbeit weisen erstmals darauf hin, dass die „Autoallergie“ einen möglichen neuen Mechanismus in der Entstehung der CU darstellt, und dass IgE-AAK dabei eine pathogenetisch wichtige Rolle spielen könnten.

8. Literaturverzeichnis

Armenaka M und Rosenstreich DL: The pathophysiology of chronic urticaria. *Clin Rev Allergy* 10: 257-279, 1992

Bakos N und Hillander M: Comparison of chronic autoimmune urticaria with chronic idiopathic urticaria. *Int J Dermatol* 42: 613-615, 2003

Bar-Sela S, Reshef T und Mekori YA: IgE antithyroid microsomal antibodies in a patient with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 103: 1216-1217, 1999

Beavil AJ, Beavil RL, Chan CM, Cook JP, Gould HJ, Henry AJ, Owens RJ, Shi J, Sutton BJ und Young RJ: Structural basis of the IgE-Fc epsilon RI interaction. *Biochem Soc Trans* 21: 968-972, 1993

Benyon RC, Robinson C, Holgate ST und Church MK: Prostaglandin D2 release from human skin mast cells in response to ionophore A23187. *Br J Pharmacol* 92: 635-638., 1987

Blank U, Ra CS und Kinet JP: Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Biol Chem* 266: 2639-2646, 1991

Braun-Falco O, Plewig G und Wolff HH: Dermatologie und Venerologie, Springer Verlag, 1994

Champion RH: Urticaria. *Nurs Mirror Midwives J* 139: 55-56, 1974

Church MK und Levi-Schaffer F: The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 99: 155-160, 1997

Cieslewicz G und Dahinden C: Cytokines in the regulation of basophil effector functions. *Allergy Asthma Proc* 17: 13-16, 1996

Coge F, Guenin SP, Rique H, Boutin JA und Galizzi JP: Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 301-309, 2001

DeLisi C und Siraganian RP: Receptor cross-linking and histamine release. I. The quantitative dependence of basophil degranulation on the number of receptor doublets. *J Immunol* 122: 2286-2292, 1979

Dvorak A: Ultrastructural analysis of anaphylactic and piecemeal degranulation of human mast cells and basophils. In: (eds.) J. C. Foreman: *Immunopharmacology of mast cells and basophils*. San Diego, 1993

Ehrlich P: Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leucocyten. *Arch Anat Physiol* 3: 166-169, 1879

Fiebiger E, Maurer D, Holub H, Reininger B, Hartmann G, Woisetschlager M, Kinet JP und Stingl G: Serum IgG autoantibodies directed against the alpha chain of Fc epsilon RI: a selective marker and pathogenetic factor for a distinct subset of chronic urticaria patients? *J Clin Invest* 96: 2606-2612, 1995

Fiebiger E, Stingl G und Maurer D: Anti-IgE and anti-Fc epsilon RI autoantibodies in clinical allergy. *Curr Opin Immunol* 8: 784-789, 1996

Foreman JC: Non-immunological stimuli of mast cells and basophil leucocytes. In: (eds.) J. C. Foreman: *Immunopharmacology of mast cells and basophils*. San Diego, 1993

Fox RW: Chronic urticaria: mechanisms and treatment. *Allergy Asthma Proc* 22: 97-100, 2001

Fritsch P: Dermatologie Venerologie, Springer Verlag, 2004

Galli SJ: New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 62: 5-33, 1990

Galli SJ: Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7: 32-39, 2000

Galli SJ und Kitamura Y: Genetically mast-cell-deficient W/W^v and Sl/Sl^d mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *Am J Pathol* 127: 191-198, 1987

Galli SJ, Zsebo KM und Geissler EN: The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 55: 1-96, 1994

Gilfillan AM, Kado-Fong H, Wiggan GA, Hakimi J, Kent U und Kochan JP: Conservation of signal transduction mechanisms via the human Fc epsilon RI alpha after transfection into a rat mast cell line, RBL 2H3. *J Immunol* 149: 2445-2451, 1992

Gordon JR, Cockcroft DW und Li XH: Cytokine expression on cross-linking of human tissue Fc epsilon RI. *Int Arch Allergy Immunol* 113: 269-271, 1997

Grabbe J, Haas N und Czarnetzki BM: [The mast cell]. *Hno* 42: 375-384, 1994

Grattan CE, Francis DM, Hide M und Greaves MW: Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 21: 695-704, 1991

Greaves MW: Chronic urticaria. *N Engl J Med* 332: 1767-1772, 1995

Greaves MW: Chronic idiopathic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3: 363-368, 2003

Greaves MW, Plummer VM, McLaughlan P und Stanworth DR: Serum and cell bound IgE in chronic urticaria. *Clin Allergy* 4: 265-271, 1974

Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V und Kaplan AP: Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 90: 213-217, 1988

Hakimi J, Seals C, Kondas JA, Pettine L, Danho W und Kochan J: The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding. *J Biol Chem* 265: 22079-22081, 1990

He D, Esquenazi-Behar S, Soter NA und Lim HW: Mast-cell heterogeneity: functional comparison of purified mouse cutaneous and peritoneal mast cells. *J Invest Dermatol* 95: 178-185, 1990

Henz BM, Zuberbier T und Grabbe J: Urtikaria, Springer Verlag, 1996

Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP und Greaves MW: Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 328: 1599-1604, 1993

Holgate ST: Allergologie. Berlin, Wiesbaden, Ullstein-Mosby-Verlag, 1996

Johnson AR, Hugli TE und Muller-Eberhard HJ: Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology* 28: 1067, 1975

Joshi KS, Hoffmann LG, Butler JE, Neville DM, Jr., Glossmann H, Towbin H, Staehelin T, Gordon J, Kadooka Y, Idota T, Gunji H, Shimatani M, Kawakami H, Dosako S, Samori T, Peng Z, Becker AB, Simons FE, Takagi K, Nakamura R, Teshima R und Sawada J: The immunochemistry of sandwich ELISAs. *Mol Immunol* 29: 971-981, 1992

Jouvin MH, Numerof RP und Kinet JP: Signal transduction through the conserved motifs of the high affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Semin Immunol* 7: 29-35, 1995

Kadooka Y, Idota T, Gunji H, Shimatani M, Kawakami H, Dosako S und Samori T: A method for measuring specific IgE in sera by direct ELISA without interference

by IgG competition or IgG autoantibodies to IgE. *Int Arch Allergy Immunol* 122: 264-269, 2000

Kern F und Lichtenstein LM: Defective histamine release in chronic urticaria. *J Clin Invest* 57: 1369-1377, 1976

Kitamura Y: Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 7: 59-76, 1989

Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N und Matsuda H: Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 306: 185-191, 1993

Koh CK, Hew FL und Chiu CL: Treatment of chronic urticaria with thyroxine in an euthyroid patient with thyroglobulin and microsomal antibodies. *Ann Acad Med Singapore* 29: 528-530, 2000

Kownatzki E: Triggering of mast cells. *Mol Immunol* 19: 1297-1300, 1982

Kubo S, Matsuoka K, Taya C, Kitamura F, Takai T, Yonekawa H und Karasuyama H: Drastic up-regulation of FcepsilonRI on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of FcepsilonRI on the cell surface. *J Immunol* 167: 3427-3434, 2001

Kühnel W: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, Georg Thieme Verlag, 1995

Kullavanijaya P, Puavilai G, Puavilai S und Chanprasertyothin S: Prevalence of thyroid antibodies in Thai patients with chronic idiopathic urticaria. *J Med Assoc Thai* 85: 901-906, 2002

Kuna P und Kaplan AP: Relationship of histamine-releasing factors and histamine-releasing inhibitory factors to chemokine group of cytokine. *Allergy Asthma Proc* 17: 5-11, 1996

Lanigan SW, Short P, Moulton P, Leznoff A, Sussman GL, Turktaş I, Gokcora N, Demirsoy S, Cakir N, Onal E, Rumbyrt JS, Katz JL, Schocket AL, Koh CK, Hew FL und Chiu CL: The association of chronic urticaria and thyroid autoimmunity. *Clin Exp Dermatol* 12: 335-338, 1987

Lawson D, Fewtrell C und Raff MC: Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads. Implications for the Ca^{2+} hypothesis of stimulus-secretion coupling. *J Cell Biol* 79: 394-400, 1978

Layton GT und Smithyman AM: A cell ELISA technique. The direct detection and semi-quantitation of immunoglobulin positive cells in 7 day lymphocyte cultures using the microtitre culture plates as the solid phase. *J Immunol Methods* 57: 37-42, 1983

Lehach JG und Rosenstreich DL: Clinical aspects of chronic urticaria. *Clin Rev Allergy* 10: 281-301, 1992

Leznoff A, Josse RG, Denburg J und Dolovich J: Association of chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity. *Arch Dermatol* 119: 636-640, 1983

Leznoff A, Sussman GL, Turktaş I, Gokcora N, Demirsoy S, Cakir N, Onal E, Rumbyrt JS, Katz JL, Schocket AL, Koh CK, Hew FL und Chiu CL: Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity: a study of 90 patients. *J Allergy Clin Immunol* 84: 66-71., 1989

Lindberg B, Svensson J, Ericsson UB, Nilsson P, Svenonius E und Ivarsson SA: Comparison of some different methods for analysis of thyroid autoantibodies: importance of thyroglobulin autoantibodies. *Thyroid* 11: 265-269, 2001

Liu C, Wilson SJ, Kuei C und Lovenberg TW: Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H_4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 121-130, 2001

Malaviya B, Mendiratta R, Kamboj VP und Agarwal SS: Enzyme linked immuno-sorbent assay for detection of antibody activity in female genital tract of immunized rabbits. *Immunol Commun* 11: 105-112, 1982

Malaviya R und Abraham SN: Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J Mol Med* 76: 617-623, 1998

Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G und Triggiani M: Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 207-217, 1997

Murphy GF, Austen KF, Fonferko E und Sheffer AL: Morphologically distinct forms of cutaneous mast cell degranulation induced by cold and mechanical stimuli: An ultrastructural study. *J Allergy Clin Immunol* 80: 603-611, 1987

Napoli DC und Freeman TM: Autoimmunity in chronic urticaria and urticarial vasculitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 1: 329-336, 2001

Neville DM, Jr. und Glossmann H: Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. *Methods Enzymol* 32: 92-102, 1974

Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, Winkelmann RK, Greaves MW und Barr RM: Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 106: 1001-1006, 1996

Oda T und Matsumoto S: Identification and characterization of histamine H4 receptor. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 118: 36-42, 2001

O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M und Greaves MW: The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br J Dermatol* 136: 197-201, 1997

Paul E und Greilich K.D.: Zur Epidemiologie der Urtikariaerkrankungen. *Der Hautarzt*: 366-375, 1991

Paus R, Heinzelmann T, Robicsek S, Czarnetzki BM und Maurer M: Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ. *Arch Dermatol Res* 287: 500-502, 1995

Paus R, Maurer M, Slominski A und Czarnetzki BM: Mast cell involvement in murine hair growth. *Dev Biol* 163: 230-240, 1994

Peng Z, Becker AB und Simons FE: Binding properties of protein A and protein G for human IgE. *Int Arch Allergy Immunol* 104: 204-206, 1994

Pigatto PD und Valsecchi RH: Chronic urticaria: a mystery. *Allergy* 55: 306-308, 2000

Recklinghausen Fv: Über Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Virchows Arch Path Anat* 28: 157-197, 1863

Ring J: Angewandte Allergologie. 2. Auflage, S. 97-103, 1992

Rorsman H: Basophilic leucopenia in different forms of urticaria. *Acta Allergol* 17: 168-184, 1962

Rumbyrt JS, Katz JL, Schocket AL, Koh CK, Hew FL und Chiu CL: Resolution of chronic urticaria in patients with thyroid autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 96: 901-905, 1995

Ryhal B, DeMera RS, Shoenfeld Y, Peter JB und Gershwin ME: Are autoantibodies present in patients with subacute and chronic urticaria? *J Investig Allergol Clin Immunol* 11: 16-20, 2001

Sabroe RA, Francis DM, Barr RM, Black AK, Greaves MW, Seed PT, Tanus T, Atkins PC und Zweiman B: Anti-Fc(epsilon)RI auto antibodies and basophil histamine releasability in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 102: 651-658, 1998

Sabroe RA, Seed PT, Francis DM, Barr RM, Black AK, Greaves MW, Tanus T, Atkins PC, Zweiman B: Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-FcepsilonRI or anti-IgE autoantibodies. Comparison of serum histamine-releasing activity and clinical manifestations in chronic idiopathic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 40: 443-450., 1999

Schafer T und Ring J: Epidemiology of urticaria. *Monogr Allergy* 31: 49-60, 1993

Schröpl F: Die chronische Urtikaria, Gustav Fischer Taschenbuch, 1986

Schwartz LB: Mast cells and their role in urticaria. *J Am Acad Dermatol* 25: 190-203, 1991

Shimizu A, Tepler I, Benfey PN, Berenstein EH, Siraganian RP und Leder P: Human and rat mast cell high-affinity immunoglobulin E receptors: characterization of putative alpha-chain gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1907-1911, 1988

Tedeschi A, Lorini M und Asero R: Anti-thyroid peroxidase IgE in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 108: 467-468, 2001

Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinet JP und Kaplan AP: Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 99: 461-465, 1997

Tsai M, Shih L-S, Newlands GFJ, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, Miller HRP, Geissler EN und Galli SJ: The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective-tissue-type and mucosal mast cells in vivo. *J Exp Med* 174: 125-131, 1991

Turktas I, Gokcora N, Demirsoy S, Cakir N, Onal E, Rumbyrt JS, Katz JL, Schocket AL, Koh CK, Hew FL und Chiu CL: The association of chronic urticaria and angioedema with autoimmune thyroiditis. *Int J Dermatol* 36: 187-190, 1997

Wasserman SI: Mast cell biology. *J Allergy Clin Immunol* 86: 590-593, 1990

Williams RC, Jr., Griffiths RW, Emmons JD und Field RC: Naturally occurring human antiglobulins with specificity for IgE. *J Clin Invest* 51: 955-963, 1972

Williams RM, Bienenstock J, Stead RH: Mast cells: The neuroimmune connection. *Chem Immunol* 61: 208-235, 1995

Zauli D, Deleonardi G, Foderaro S, Grassi A, Bortolotti R, Ballardini G und Bianchi FB: Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Allergy Asthma Proc* 22: 93-95, 2001

Zauli D, Grassi A, Ballardini G, Contestabile S, Zucchini S und Bianchi FB: Thyroid autoimmunity in chronic idiopathic urticaria: implications for therapy. *Am J Clin Dermatol* 3: 525-528, 2002

Zweiman B, Valenzano M und Atkins PC: Modulation of serum histamine releasing activity in chronic idiopathic urticaria. *Immunopharmacology* 39: 225-234, 1998

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Elektronenmikroskopisches Bild einer Mastzelle. Seite 11

Quelle: Sobotta Histologie, Hrsg. Welsch, 5. Auflage, Urban und Schwarzenberg 1997.

Abbildung 2: Übersicht der antikörpervermittelten Aktivierungsmechanismen der Mastzelle. Seite 15

Abbildung 3: Hautveränderungen bei chronischer Urtikaria. Seite 21

Abbildung 4: Prinzip des ELISA. Seite 42

Abbildung 5: Ergebnis einer site-directed-TPO-ELISA-Platte. Seite 47

Abbildung 6: Vorkommen auffälliger SD-Befunde in einem CU-Patientenkollektiv. Seite 53

Abbildung 7: Messung der IgE-anti-TPO-Konzentration im Vergleich zwischen dem konventionellen ELISA und dem neu entwickelten site-directed-IgE-ELISA. Seite 55

Abbildung 8: Messergebnis einer capture-IgE-anti-TPO-ELISA Platte im 3D-Diagramm. Seite 56

Abbildung 9: Eichkurve der IgE-anti-TPO-Standard-Verdünnungsreihe. Seite 57

Abbildung 10: SDS-Page/Western Blot des Schilddrüsenproteins Thyreoidperoxidase (TPO). Seite 59

Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung von CU-Patienten und Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der IgE-anti-TPO Konzentration in IU/ml.

Seite 61

Abbildung 12: Korrelation der IgE-anti-TPO-Konzentration und der IgG-anti-TPO-Konzentration (A), bzw. der IgE-Gesamtkonzentration (B).

Seite 63

Abbildung 13: Ergebnis eines β -Hexosaminidase release assay an RBL-2H3-Zellen. Seite 65

Abbildung 14: Darstellung der Befundergebnisse einer CU-Patientin nach Thyreodektomie über einen Zeitraum von 10 Wochen. Seite 67

9.2 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der Mastzelle im Überblick. Seite 12

Tabelle 2: Klassifikation der Urtikariaerkrankungen. Seite 23

Tabelle 3: Geräte und Instrumente. Seite 34

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial. Seite 35

Tabelle 5: Chemikalien und Antikörper. Seite 36

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Allen, die mir geholfen und dazu beigetragen haben, diese Arbeit fertig zu stellen. Mein Dank gilt auch dafür, dass ich immer mit Freude an die Arbeit im Labor zurück denken kann. Insbesondere danke ich folgenden Personen:

11. Lebenslauf

Name: Herman Hidajat

Geboren am: 14.07.1975, in Wolfsburg.

Beruf: Zahnarzt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig