

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

DISSERTATION

Der Einfluss von Histamin, dem H₄-Rezeptor und dem H₂-Rezeptor auf die Regulation und Expression von IL-18 und dem IL-18 Rezeptor auf humanen eosinophilen Granulozyten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Leonie Beyer
aus Walsrode

Hannover 2023

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 12.02.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:	Prof. Dr. med. Michael P. Manns
Betreuer:	Prof. Dr. med. Thomas Werfel, Dr. med. vet. Katrin Schaper-Gerhardt
Co-Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Detlef Neumann
1. Referent	Prof. Dr. rer. nat. Detlef Neumann
2. Referent	Prof. Dr. rer. nat. Armin Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2024

Prüfungsausschussmitglieder

Vorsitz:	Prof. Dr. med. Torsten Witte
1. Prüfer:	Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt
2. Prüfer:	Prof. Dr. med. Ludger Leifeld

INHALTSVERZEICHNIS

Widmung.....	VI
Vorwort.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung in die Atopische Dermatitis	1
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese.....	1
1.1.2 Klinik, immunologische Prozesse und Therapie	2
1.2 Histamin	4
1.2.1 Histaminrezeptoren.....	4
1.2.2 Histamin und H ₄ R in AD.....	5
1.3 Eosinophile Granulozyten.....	7
1.3.1 Eosinophile Granulozyten in AD.....	7
1.3.2 Rolle des H ₄ R und H ₂ R auf Eosinophilen Granulozyten von AD-Patienten.....	8
1.4 IL-18 und IL-18 Rezeptor	9
1.4.1 Rolle von IL-18 und IL-18R in AD.....	11
1.4.2 Rolle von IL-18 und IL-18R auf Eosinophilen.....	11
1.5 Ziel der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Kits (Baukästen)	13
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen	13
2.1.3 Stimulanzen	14
2.1.4 Antikörper.....	15
2.1.5 Primer	15
2.1.6 Labormaterialien.....	16
2.1.7 Laborgeräte.....	17
2.1.8 Computerprogramme.....	17
2.2 Patientenkollektiv und Studiendesign.....	19

2.3	Methoden.....	20
2.3.1	Isolation von eosinophilen Granulozyten aus Frischblut.....	20
2.3.2	Stimulation und Zellkultur.....	22
2.3.3	Zelllyse und Überstandsextraktion	22
2.3.4	RNA-Isolation aus lysierten eosinophilen Granulozyten	23
2.3.5	Umschreiben von RNA zu cDNA	24
2.3.6	Real-Time PCR.....	25
2.3.7	Durchflusszytometrie.....	27
2.3.8	ELISA	28
2.4	Statistische Analysen	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Untersuchungen zu IL-18.....	31
3.1.1	Histamin induziert die Hochregulation der IL-18 mRNA Expression über den H ₄ R und H ₂ R in AD-Patienten	31
3.1.2	IL-18 Protein Expression im ELISA nicht nachweisbar	32
3.1.3	IL-18 mRNA Induktion durch Histamin korreliert im Trend mit Anteil an Eosinophilen im Blut und SCORAD.....	33
3.1.4	Unveränderte IL-37 mRNA Expression in Histamin-stimulierten Eosinophilen von AD-Patienten	33
3.2	Untersuchungen zum IL-18R.....	34
3.2.1	Histamin induziert die Hochregulation der IL-18R mRNA Expression über den H ₄ R und H ₂ R in AD-Patienten	34
3.2.2	Histamin vermittelt die Hochregulation der IL-18R α Expression über den H ₂ R auf Proteinebene	36
3.2.3	Die IL-18R α Induktion durch Histamin korreliert mit Anteil an Eosinophilen im Blut	39
3.2.4	Histamin potenziert die IFN- γ -vermittelte Hochregulation der IL-18R α Expression über den H ₂ R.....	39
3.2.5	Histamin hebt die IL-5-vermittelte Herunterregulation der IL-18R α Expression über den H ₄ R auf.....	42
3.2.6	Kein Einfluss von IL-18 auf die IL-18R α Expression.....	44

3.2.7	Untersuchungen zur funktionellen Expression des IL-18R Proteins auf humanen Eosinophilen	44
3.3	Untersuchungen zu CD69	47
3.3.1	Histamin verstärkt die IL-5-vermittelte Hochregulation der CD69 Protein Expression über den H ₄ R in AD-Patienten.....	47
3.3.2	Histamin verstärkt die IFN- γ -vermittelte Hochregulation der CD69 Protein Expression in AD-Patienten	50
3.3.3	Leichte Steigerung der CD69 Protein Expression durch Kombination von Histamin mit IL-4 oder IL-13.....	52
4	Diskussion.....	53
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	53
4.2	Diskussion der Methodik	53
4.3	Diskussion der Ergebnisse	54
4.3.1	Einfluss von Histamin auf IL-18 und den IL-18R α auf Eosinophilen	55
4.3.2	Einfluss von Histamin mit INF- γ / IL-5 auf den IL-18R α auf Eosinophilen	57
4.3.3	Korrelationen von IL-18 und dem IL-18R α mit dem Krankheitsgeschehen.....	59
4.3.4	Einfluss von IL-18 auf den IL-18R α	60
4.3.5	Funktionalität des IL-18R.....	60
4.3.6	Einfluss von Histamin mit IFN- γ und IL-5 auf die Aktivität von Eosinophilen	61
4.3.7	Zusammenfassung	62
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Verzeichnis der Abbildungen.....	74
8	Verzeichnis der Tabellen.....	75
	Lebenslauf.....	76
	Eidesstattliche Erklärung	77
	Anhang.....	78
	Danksagung.....	80

Widmung

meiner lieben Familie

Vorwort

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde in dieser wissenschaftlichen Arbeit bei Personenbezeichnungen und personenbezogenen Hauptwörtern ausschließlich die männliche Form verwendet. Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der Gleichbehandlung grundsätzlich für alle Geschlechter.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AD	Atopische Dermatitis, Neurodermitis, Atopisches Ekzem
Amthamin	Selektiver H ₂ R-Agonist
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BALF	bronchoalveolar lavage fluid
Basophiler	Basophiler Granulozyt
Cat.-nr.	Katalog-Nummer
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAK	Detektions-Antikörper
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil-derived neurotoxin
ELISA	Enzyme-linkend immunoabsorbent assay
Eosinophiler	Eosinophiler Granulozyt
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCεRI	High affinity receptor for the FC region of immunoglobulin E
FITC	Fluoresceinisothiocyanit
FSC	forward scatter
g	g-Zahl (relative Zentrifugalbeschleunigung)
gDNA	genomic DNA
h	Stunde
H ₁ R	Histamin-1-Rezeptor
H ₂ R	Histamin-2-Rezeptor
H ₃ R	Histamin-3-Rezeptor
H ₄ R	Histamin-4-Rezeptor
HR	Histamin-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-18R	Interleukin-18 Rezeptor
IL-18Rα	α-Kette des Interleukin-18-Rezeptors
JNJ7777120	Selektiver H ₄ R-Antagonist
LC	Langerhans-Zelle

IX

MC	Mastzelle
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
n	Stichprobengröße
Neutrophiler	Neutrophiler Granulozyt
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NS	Nicht-stimuliert
p	p-Wert (Wahrscheinlichkeit)
PBMC	peripheral mononuclear blood cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Programmed death ligand 1
PE	Phycoerythrin
Ranitidin	Selektiver H2R-Antagonist
RD	Reagent diluent
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	RNA-spaltendes Enzym
RPS 20	Ribosomales Protein S20
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-time Polymerase-Kettenreaktion
S. aureus	Staphylococcus aureus
S2k-Leitlinie	Konsensbasierte Leitlinie
SCORAD	scoring atopic dermatitis
sek	Sekunde
SSC	side scatter
ST-1006	Selektiver H4R-Agonist
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Atopische Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD), auch Neurodermitis oder Atopisches Ekzem genannt, ist eine häufig auftretende, chronisch-inflammatorische Hauterkrankung. Klinisch manifestiert sie sich vorrangig in Form von ekzematösen Hautläsionen und ausgeprägtem Pruritus, wodurch Betroffene eine erhebliche Einschränkung ihrer gesundheitsbezogenen Lebensqualität erfahren (Werfel et al., 2016b). Die Erstmanifestation der AD liegt meist im Kleinkindalter noch vor dem fünften Lebensjahr. Mit Einsetzen der Pubertät kommt es bei der Mehrheit der Betroffenen zu einer spontanen Remission der Erkrankung, jedoch kann sie auch bis ins Erwachsenenalter fortbestehen. Als Ursache wird ein Zusammenspiel aus genetischen, immunologischen und allergischen Faktoren angenommen. Die AD kann nicht geheilt, aber therapeutisch symptomkontrolliert werden (Nuttan, 2015).

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Bundesweit liegt die Prävalenz der AD gemäß der Inanspruchnahme medizinischer Leistungen bei etwa 23% der Säuglinge und Kleinkinder, 8% der Schulkinder und bei bis zu 4% der Erwachsenen (Werfel et al., 2016b). Demnach handelt es sich bei der AD um die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter (Schmitt et al., 2009). Weltweit gesehen bestehen große Unterschiede (0,9%–22,5%) in der Prävalenz der AD. Während Industriestaaten wie Deutschland in den letzten Jahrzehnten einen deutlichen Anstieg um bis zu 300% verzeichneten (Nuttan, 2015), steigen die Zahlen in Entwicklungsländern mit bisher niedrigen Prävalenzen hingegen erst seit kurzem. Gemäß einer aktuellen internationalen Studie zur Variation der Prävalenz von AD im Kindesalter (ISAAC Phase drei Studie) nimmt diese gerade in der Altersgruppe junger Kinder (6-7 Jahre) global gesehen weiter zu (Odhiambo et al., 2009).

Obwohl sich die AD in 85% der Fälle vor dem fünften Lebensjahr manifestiert und sich vorrangig im Kindesalter abspielt, ist ihre Relevanz auch im Erwachsenenalter hoch. Mindestens 30% der betroffenen Kinder übernehmen die Erkrankung ins Erwachsenenalter und leiden weiterhin unter chronischen Rezidiven mit zumindest temporären Anzeichen einer AD (Werfel et al., 2016b). Die medizinischen Kosten für die Behandlung sowie die z.T. eingeschränkte Erwerbstätigkeit stellen für Betroffene und das Gesundheitssystem eine beträchtliche finanzielle Belastung dar (Drucker et al., 2017).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Erkrankung sind bis heute Gegenstand aktueller Forschung. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist für die Entwicklung einer AD ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren erforderlich (Werfel, 2009).

Als *ein* wesentlicher Bestandteil gilt die Hautbarrierestörung, die durch genetische Varianten in epidermalen Strukturproteinen oder dem angeborenen/erworbenen Immunsystem entstehen kann (Scheerer und Eyerich, 2018). In 30% der Fälle ist die beeinträchtigte Hautbarriere auf eine *loss-of-function* Mutation im Filaggrin-Gen zurückzuführen (Palmer et al., 2006). Diese geht mit epidermalem Wasserverlust (Hauttrockenheit) und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Allergenen und Infektionserregern wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) einher (Candi et al., 2005). Auch die Filaggrin-exprimierenden Schleimhäute von Mund- und Nasenhöhle sind hierbei von der Dysfunktion betroffen (Presland und Dale, 2000). Mit Letzterem ist das charakteristische Vorschreiten einer im frühen Kindesalter entwickelten AD über den Erwerb von Lebensmittel- und respiratorischen Allergien im weiteren Verlauf assoziiert und wird als „*atopic march*“ bezeichnet (Nutten, 2015). Insgesamt weisen etwa 60-80% aller Betroffenen nachweisbare Sensibilisierungen auf, dabei am häufigsten gegen Hausstaubmilben, Tierepithelien, Pollen und Nahrungsmittel. Diese Form der AD lässt sich dem extrinsischen Subtyp zuordnen. Bei 20-40% hingegen liegen keine IgE-vermittelten Sensibilisierungen und damit die intrinsische Unterform vor (Schmid-Grendelmeier et al., 2001).

Zu den immunologischen Ursachen einer AD zählt beispielsweise die Dysregulation von T-Zellen, welche fehlgeleitet über IFN- γ die Apoptose von hornbildenden Hautzellen, den Keratinozyten, induzieren können. Das Eindringen von Triggerfaktoren wird so über die beeinträchtigte Hautbarriere begünstigt (Werfel, 2009).

Triggerfaktoren sind über die genetische Disposition hinaus von zentraler Bedeutung für das Einsetzen einer AD und für akute Exazerbationen (Werfel et al., 2014). Dazu zählen Allergene, physikalische Reize (z.B. kratzen) und psychosozialer Stress, aber auch eine Reihe von Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung oder Tabakrauch (Scheerer und Eyerich, 2018).

1.1.2 Klinik, immunologische Prozesse und Therapie

Klinisch zeigt sich die AD klassischerweise durch eine Xerosis cutis (Hauttrockenheit) sowie stark juckende, ekzematöse Hautläsionen, die in Abhängigkeit vom Alter in typischen Lokalisationen anzutreffen sind. Bei Säuglingen beginnt die AD häufig mit dem atopischen Säuglingsekzem (Milchschorf) und zeigt sich an Wangen und Streckseiten der Extremitäten, während bei Kindern über zwei Jahren, Jugendlichen und Erwachsenen die Ekzeme auf den Beugeseiten der Extremitäten und am Schultergürtel zu finden sind (Bieber und Novak, 2004; Werfel et al., 2014). Neben den Leitsymptomen können Betroffene eine Vielzahl an weiteren, fakultativen Symptomen wie die Rarifizierung der lateralen Augenbrauen (Hertoghe Zeichen), eine doppelte Unterlidfalte (Dennie-Morgan-Zeichen) oder Nagelveränderungen aufweisen (Vakharia und Silverberg, 2019). Im Verlauf der Erkrankung führt das anhaltende Entzündungsgeschehen zur Lichenifikation der betroffenen Hautareale (Werfel, 2009). In Abbildung 1 sind die immunologischen Vorgänge in der Haut eines AD-Patienten abgebildet.

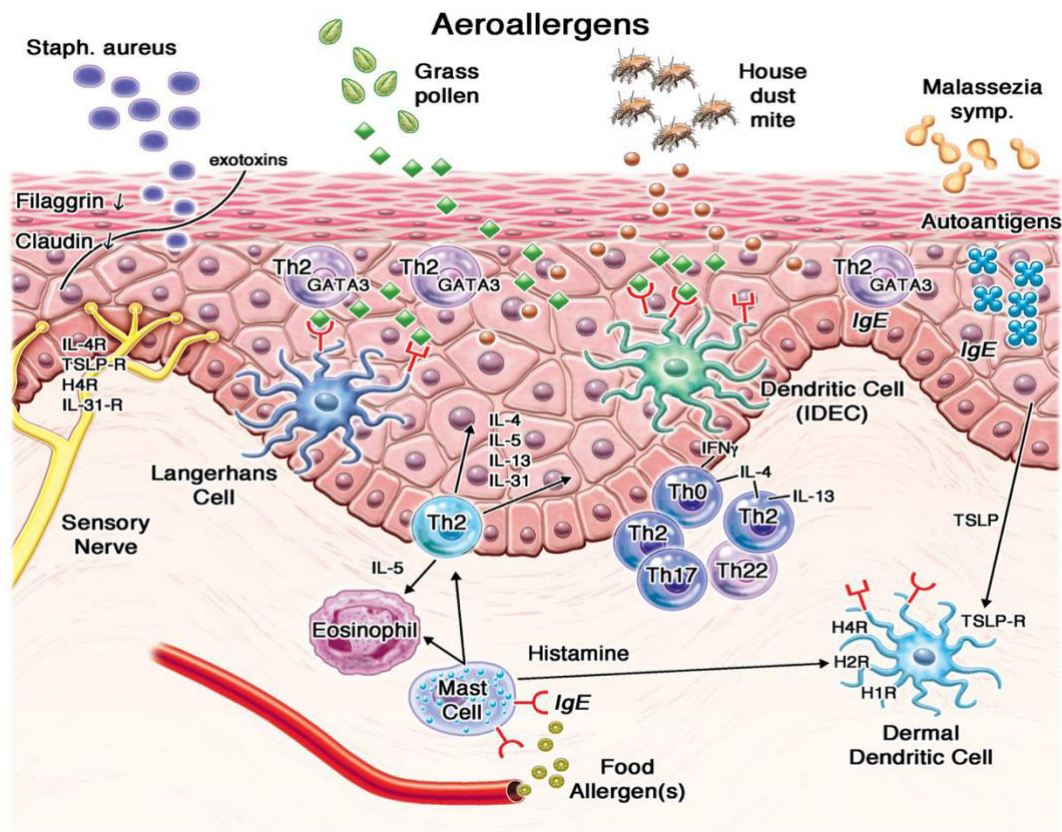


Abbildung 1: Immunologische Vorgänge im Entzündungsgeschehen der AD

Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Auf immunologischer Ebene wird das akute Entzündungsgeschehen durch das Eindringen von Allergenen (z.B. Graspollen, Hausstaubmilben) oder Mikrobenprodukten (z.B. von Staph. aureus, Malassezia symp.) über die defekte Hautbarriere (z.B. durch Filaggrin↓, Claudin↓) angestoßen. Bei vorangegangener Allergen-Sensibilisierung finden sich in der (Epi-)Dermis IgE-exprimierende Langerhans-Zellen, dendritische Zellen und Mastzellen, die über Antigenpräsentation bzw. Zytokinausschüttung eine T-Helferzellen Typ 2- (Th2) gerichtete Immunantwort mit einem Th₂-assoziierten Zytokinmilieu aus IL-4, IL-5 und IL-13 induzieren. Weitere proinflammatorische Zelltypen wie Eosinophile und inflammatorische dendritische Zellen werden ins Entzündungsgeschehen der Haut rekrutiert. Histamin, IL-31 und *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) lösen unter Mitwirken von sensiblen Nervenfasern den charakteristischen, intensiven Juckreiz aus. Infolge einer anhaltenden Infiltration der Haut durch die genannten Entzündungszellen vollzieht sich im Verlauf über eine zunehmende IL-12-Produktion ein Wechsel zu einer Th₁-gerichteten Immunantwort, der chronischen Phase (nicht dargestellt) (Leung et al., 2004; Werfel et al., 2016a).

Die Therapiemöglichkeiten der AD sind symptomorientiert (Nutten, 2015). Grundlage der Behandlung ist eine topische Basistherapie, bestehend aus fettenden bzw. hydratisierenden Salben zur Prävention von Entzündungen. Im akuten Inflammationsgeschehen werden topische Glukokortikoide und Calcineurininhibitoren eingesetzt, bei schweren Verläufen ist auch eine zeitlich begrenzte, systemische Anwendung möglich. Wissenschaftliche Fortschritte im

Krankheitsverständnis der AD brachten jedoch jüngst neue, zielgerichtete Therapieansätze hervor (mittels sog. Biologika), welche eine langfristig wirksame Kontrolle der AD ermöglichen und den Therapiebereich revolutionierten. Zu den für die AD-Therapie zugelassenen Biologika gehören der Anti-IL-4-Rezeptor-Antikörper Dupilumab (Zulassung 2017), die Januskinase-Inhibitoren Baricitinib, Upadacitinib und Abrocitinib (Zulassung 2020/21) sowie der IL-13-Inhibitor Tralokinumab (Zulassung 2021) (Bieber, 2021).

Neben der antiinflammatorischen Therapie ist die antipruritische Behandlung des häufig quälenden Juckreizes von zentraler Bedeutung für die Lebensqualität der Betroffenen (Umehara et al., 2021). Histamin- H_1 R-Antagonisten, die sich in anderen allergischen Erkrankungen wie allergischer Urtikaria, Rhinitis und Konjunktivitis als wirksam erwiesen haben (Thurmond, 2015), zeigen bei AD jedoch keinen evidenzbasierten Nutzen. Bislang ist das Spektrum der laut Neurodermitis S2k-Leitlinie empfohlenen Antipruriginosa nur unzureichend und offenbart die enormen Herausforderungen in der Behandlung von Juckreiz in AD (Werfel et al., 2016b).

1.2 Histamin

Histamin ist ein biogenes Amin (Aminosäurederivat) und kann als Signalmolekül zahlreiche immunmodulatorische und rezeptorabhängige Funktionen im menschlichen Körper vermitteln (Panula et al., 2015). Für die Bildung von Histamin aus der Aminosäure Histidin ist das Enzym L-Histidindecaboxylase erforderlich. Dieses ist weit verbreitet und erlaubt einer Vielzahl an Zellen die Histaminsynthese, darunter insbesondere Mastzellen und basophilen Granulozyten (Basophile) (Simons und Simons, 2011). Die Freisetzung von Histamin wird durch Entzündungsmediatoren (Bradykinin, Substanz P) oder Antigenkontakt im Rahmen einer allergischen Reaktion vom Sofort-Typ stimuliert (Heinrich et al., 2014).

1.2.1 Histaminrezeptoren

Während des letzten Jahrhunderts wurden vier verschiedene, G-Protein gekoppelte Histaminrezeptoren (HR) entdeckt, an die Histamin für die Vermittlung seiner Effekte bindet. Angefangen mit dem Histamin $_1$ -Rezeptor (H_1 R) im Jahr 1917, über den H_2 R 1972 und den H_3 R 1983 wurde zuletzt im Jahr 2000 der H_4 R identifiziert (Schaper-Gerhardt et al., 2020a).

Der H_1 R ist insbesondere für seine Rolle in allergischen Reaktionen vom Sofort-Typ bekannt. Das durch Mastzelldegranulation freigesetzte Histamin bindet über den H_1 R an der glatten Muskulatur von Bronchien und Gefäßen, führt zu Bronchokonstriktion und vaskulärer Permeabilitätssteigerung und ruft Krankheitsbilder wie allergisches Asthma, allergische Rhinitis sowie Anaphylaxie hervor (O'Mahony et al., 2011).

Der H_2 R ist vor allem aufgrund seiner regulativen Funktion bei der Magensäureproduktion von klinischer Bedeutung. Aber auch ein breites Spektrum an Immunzellen exprimiert ihn, über das er immunregulatorische Funktionen wie die Th_1 -Zytokinproduktion und T-Zell-Proliferation bewirken kann (O'Mahony et al., 2011). Mit Bezug auf die AD konnte von unserer Arbeitsgruppe

gezeigt werden, dass der H₂R die Produktion des Chemokins CCL17 in M2 Makrophagen potenziert, welches als Biomarker für die Aktivität der AD gilt (Mommert et al., 2018b).

Der H₃R ist ein präsynaptischer Autorezeptor, der sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem lokalisiert ist. Er ist in die Regulation von Schlaf-Wach-Rhythmus, Kognition und Neuroinflammation involviert (O'Mahony et al., 2011).

Der H₄R gilt als der am wenigsten erforschte HR, was auf seine späte Entdeckung zurückzuführen ist. Obwohl er strukturell dem H₃R sehr ähnelt (Cogé et al., 2001), wird er im Knochenmark sowie auf Leukozyten exprimiert. Aufgrund seines dortigen Vorkommens wurde nach der Identifikation rasch seine immunologisch relevante Rolle angenommen (Thurmond, 2015). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten daraufhin einen aktivierenden und migrationsfördernden Effekt des H₄R auf eosinophile Granulozyten, Mastzellen, T-Zellen und dendritischen Zellen nachweisen (Dunford et al., 2006; Gutzmer et al., 2005; Hofstra et al., 2003; Ling et al., 2004). Neben der Implikation in inflammatorischen Immunantworten wurde für den H₄R außerdem ein Zusammenhang mit Histamin-induziertem Pruritus vermutet, nachdem in einem Mausmodell ein dosisabhängiges, H₄R-induziertes Kratzen beobachtet werden konnte (Bell et al., 2004; Rossbach et al., 2011). Histamin selbst ist für seine Rolle als Juckreizmediator seit den Erfolgen der H₁R-Antagonisten in der Behandlung von Pruritus in allergischen Erkrankungen weitbekannt (Simons und Simons, 2011). H₄R-Antagonisten hingegen könnten für die Behandlung von nicht durch H₁R-Antagonisten kontrollierbarem Pruritus von Bedeutung sein (de Esch et al., 2005), für den es bisher an Therapiemöglichkeiten mangelt.

1.2.2 Histamin und H₄R in AD

Histamin rückte aufgrund seiner hohen Konzentrationen in läsionaler sowie nicht-läsionaler Haut von AD-Patienten ins Blickfeld der AD-Therapie und –Grundlagenforschung (Johnson et al., 1960; Juhlin, 1967). Trotz jahrzehntelanger Bemühungen ist die genaue Rolle von Histamin in der Pathogenese der AD bis heute nicht vollends aufgeklärt. Da sich weder H₁R- noch H₂R-Antagonisten als therapeutisch wirksam erweisen konnten (Thurmond, 2015), ist seither die Erforschung des H₄R in der AD von großem Interesse. Abbildung 2 gibt eine Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse über die Rolle des H₄R auf für die AD relevanten Zellen wieder.

In verschiedenen Studien konnte bereits *in vivo* eine Verbesserung der AD-Symptomatik (siehe 1.1.2) bei H₄R-Antagonisierung beobachtet werden. Allerdings lieferten Mausmodelle mit auf unterschiedliche Weise induzierter AD teils widersprüchliche Resultate (Cowden et al., 2010; Ohsawa und Hirasawa, 2012; Rossbach et al., 2016; Roßbach et al., 2009).

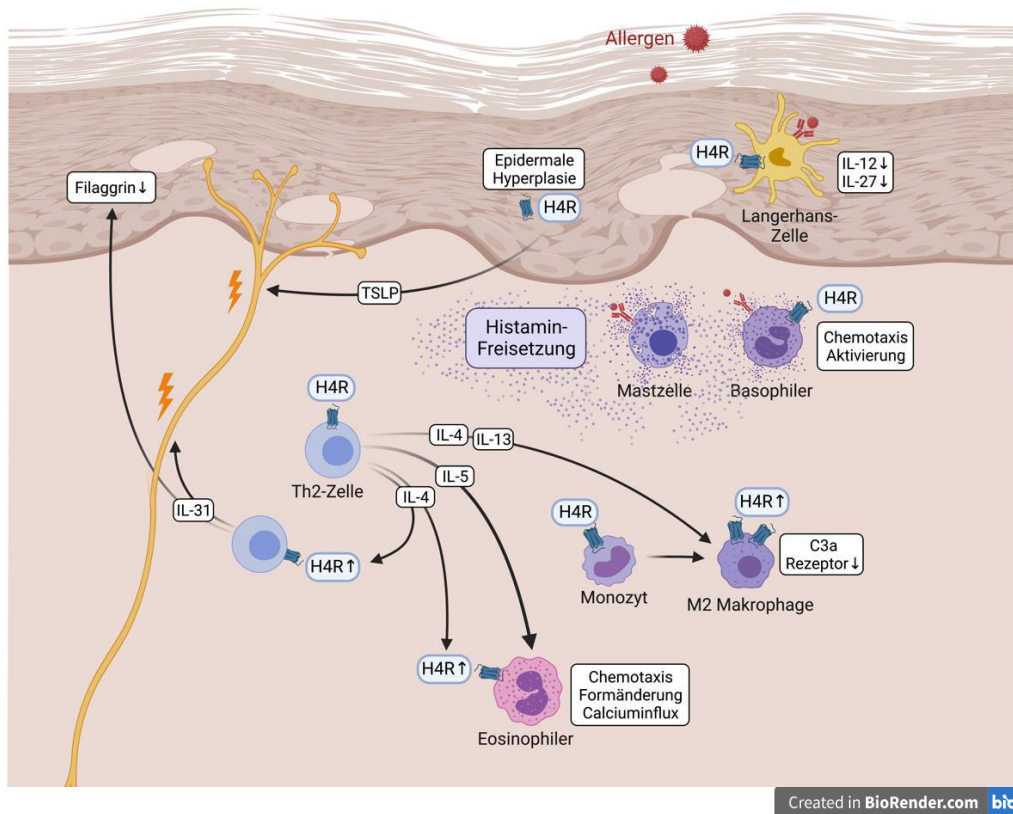


Abbildung 2: Rolle des H₄R auf für die AD relevanten Zellen

Der H₄R übt auf die im Hautinfiltrat der AD vorhandenen Leukozyten und die Umgebung (Keratinozyten, Nervenendigungen) proinflammatorische Effekte aus.

Histamin wird von Mastzellen und Basophilen durch Antigenkontakt freigesetzt. Über die Bindung an den H₄R von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs, hier Langerhans-Zellen) führt es zur Verringerung der Produktion der Th₁-Zytokine IL-12 und IL-27 (Gutzmer et al., 2005), sodass ein Th₂-dominierendes Zytokinmilieu aus IL-4, IL-5 und IL-13 entsteht (Schaper-Gerhardt et al., 2020a). IL-4 wiederum führt zu einer Hochregulation des H₄R auf Th₂-Zellen (Gutzmer et al., 2009), aber auch auf Makrophagen (Mommert et al., 2021) und eosinophilen Granulozyten (Schaper-Gerhardt et al., 2020b). Letztere werden durch IL-5 rekrutiert und reagieren auf H₄R-Stimulation mit Chemotaxis, Calciuminflux und Form-veränderungen sowie der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (Buckland et al., 2003; Grosicki et al., 2016; Ling et al., 2004; Reher et al., 2012). IL-13 und IL-4 induzieren weiterhin die Polarisation vom Makrophagen zum M2 Phänotyp, deren Komplementrezeptor C3aR bei H₄R-Stimulation herunterreguliert wird (Mommert et al., 2018a). Th₂-Zellen wiederum erhöhen die mRNA-Expression von IL-31 (Gutzmer et al., 2009), welches über die schmerzleitenden, neuronalen C-Fasern der Haut und den Einfluss auf die Differenzierung von Keratinozyten Pruritus und Entzündung vermittelt (Nakashima et al., 2018). Auf Keratinozyten konnte der H₄R in Zusammenhang mit epidermaler Hyperplasie (Glatzer et al., 2013) und der vermehrten Freisetzung des ebenfalls an sensiblen Neuronen agierenden *thymic stromal lymphopoietin* gebracht werden (Schaper et al., 2016).

Die bisherigen klinischen Studien am Menschen (Phase 2) mit den H₄R-Antagonisten JNJ-39758979 und ZPL-3893787 hingegen legten einen therapeutischen Nutzen in moderater bis schwerer AD nahe (Murata et al., 2015; Werfel et al., 2018). Die Entwicklung von wirkungsvollen antipruritischen und langfristig einsetzbaren antiinflammatorischen Therapien ist angesichts der steigenden Prävalenz und der mit unter schweren Einschränkungen der Lebensqualität von Betroffenen mit AD weiterhin von großer Dringlichkeit (Schaper-Gerhardt et al., 2020a).

1.3 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten (Eosinophile) gehören zu den Leukozyten und lassen sich durch den typischerweise bilobulären Zellkern sowie die große Menge an zytotoxischen Granula im Zytoplasma charakterisieren (Fulkerson und Rothenberg, 2018). Sie wurden erstmals von Paul Ehrlich im Jahr 1879 beschrieben und erhielten von ihm, dank ihrer Anfärbbarkeit mit dem in der Histologie gebräuchlichen, azidophilen Farbstoff Eosin, ihren Namen (Rosenberg et al., 2013). In Gesunden liegt ihr Anteil bei 2-4 % aller Leukozyten im Blut.

Eosinophile reifen im Knochenmark aus pluripotenten Progenitorzellen heran und differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-5 und IL-18 (Kandikattu et al., 2019). Die Rekrutierung in periphere Gewebe wird vor allem durch IL-5 und Eotaxine reguliert (Rosenberg et al., 2013). Als primär gewebeständige Zellen tragen sie im Gastrointestinaltrakt sowie in den Mammæ, dem Uterus, Thymus und Fettgewebe zur Gewebekomöostase und –morphogenese bei (Kita, 2013). Unter pathologischen Bedingungen können Eosinophile auch in anderen Geweben wie z.B. der Haut oder der Lunge gefunden werden, in denen sie maßgeblich an der Pathogenese allergischer Erkrankungen (AD, allergisches Asthma) beteiligt zu sein scheinen (Jacobsen et al., 2007; Werfel et al., 2016). Am längsten bekannt ist ihre Funktion in der Abwehr von Helminthen, doch auch in diesem Feld sind noch viele Fragen ungeklärt (Rosenberg et al., 2013).

Ihren immunmodulatorischen Einfluss vermitteln Eosinophile zum einen über die Sekretion basischer Granulaproteine und verschiedener Zytokine, zum anderen auch über die Antigen-Präsentation mittels MHC II-Molekülen (Hogan et al., 2008). Zu den Granulaproteinen gehören das *major basic protein* (MBP), die *eosinophil peroxidase* (EPX), das *eosinophil cationic protein* (ECP) und das *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) (Rosenberg et al., 2013).

1.3.1 Eosinophile Granulozyten in AD

Eosinophile sind seit langer Zeit Gegenstand intensiver Forschung im Bereich der AD. Betroffene weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen sowie eine größere Menge der zytotoxischen Granulaproteine ECP und EDN im Blut auf. Letztere korrelieren dabei signifikant mit dem SCORAD und der Krankheitsaktivität (Kägi et al., 1992; Kapp et al., 1991; Taniuchi et al., 2001). Zusätzlich infiltrieren Eosinophile die läsionale Haut von AD-Patienten wie in Abbildung 3 dargestellt ist, in der sie ihre zytotoxischen Granula ablagern (Simon et al., 2004). Ihre Überlebenszeit ist im peripheren Gewebe durch

inflammatorische Stimuli im Rahmen der AD verlängert (Rosenberg et al., 2013). Aktivierte Eosinophile lassen sich durch das Oberflächenantigen CD69 detektieren (Ziegler et al., 1994).

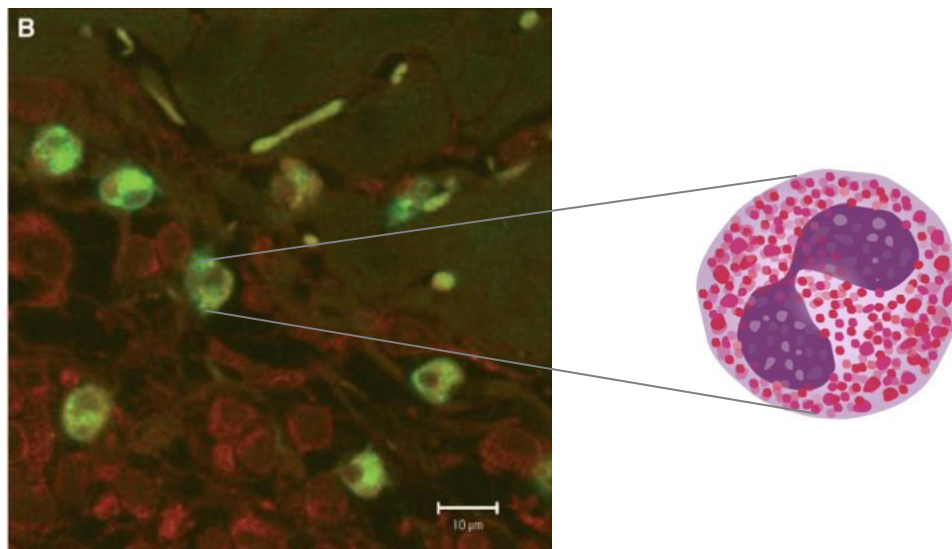


Abbildung 3: Eosinophileninfiltrat in läsionaler Haut von einem AD-Patienten

Abbildung der Immunfluoreszenz mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons

Abbildung „Eosinophilen Granulozyt“ mit freundlicher Genehmigung von DocCheck Community

Die Immunfluoreszenz zeigt ein eosinophilenreiches Hautinfiltrat. Die Eosinophilen (grün fluoreszierend) stellen sich mit einem bilobulären Nukleus dar und sind in den akuten Läsionen im Bereich der Blutgefäße (erkennbar an den rot fluoreszierenden Erythrozyten) zu finden. Von dort aus wandern sie in die Dermis aus (Simon et al., 2004).

1.3.2 Rolle des H₄R und H₂R auf Eosinophilen Granulozyten von AD-Patienten

Eosinophile von AD-Patienten weisen im Vergleich zu Gesunden eine signifikant höhere Basisexpression der H₄R mRNA auf, wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Schaper-Gerhardt et al., 2020b). Vor diesem Hintergrund ist eine besondere Rolle des H₄R auf Eosinophilen von AD-Patienten anzunehmen. Die Tatsache, dass Eosinophile von Patienten mit Psoriasis, welche vergleichend mit untersucht wurden, keine erhöhte H₄R mRNA Expression aufwiesen, veranschaulicht diesen Zusammenhang. Interessanterweise führte die Stimulation mit Th₂-Zytokinen (IL-4, IL-5 und IL-13) zu einer weiteren, signifikanten Steigerung der H₄R mRNA Basisexpression in AD-Patienten (Schaper-Gerhardt et al., 2020b). Eine Reihe an funktionellen Untersuchungen des H₄R konnte demonstrieren, dass seine Stimulation zu Chemotaxis und einer partiellen Aktivierung von Eosinophilen führt (Buckland et al., 2003; Grosicki et al., 2016; Ling et al., 2004; Reher et al., 2012). Die beobachteten Veränderungen von Eosinophilen sind in Abbildung 2 beschrieben.

Neben dem H₄R exprimieren Eosinophile auch den H₂R als weiteren HR. Im Unterschied dazu konnten der H₁R und H₃R nicht von unserer Arbeitsgruppe auf Eosinophilen detektiert werden. Wie Ergebnisse anderer Studien zum H₂R in der AD zeigen, scheint auch dieser, mit Bezug auf ein besseres Krankheitsverständnis, nennenswerte Effekte zu vermitteln (Mommert et al., 2018b; Mommert et al., 2021). Im Vergleich zum H₄R ist die H₂R mRNA Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten jedoch niedriger und unterscheidet sich nicht von der H₂R mRNA Expression von Gesunden (Schaper-Gerhardt et al., 2020b).

Obwohl über eine H₄R-vermittelte, partielle Aktivierung Eosinophiler von mehreren Arbeitsgruppen berichtet wurde, sind die immunmodulatorischen Folgen noch weitgehend unerforscht. Aus diesem Grund wurde in unserer Abteilung eine RNA-Sequenzierung von Eosinophilen von AD-Patienten durchgeführt und der Einfluss von Histamin und dem H₄R auf die Regulation von einem breiten Spektrum an Genen überprüft (Beyer et al., 2022).

Dazu wurden Eosinophile von vier Spendern mit Histamin und dem H₄R-Agonisten ST-1006 stimuliert und nach 6 h Inkubationszeit auf einen korrespondierenden Effekt der beiden Stimuli hin analysiert. Insgesamt ergaben sich etwa 200 Gene, die sowohl durch Histamin als auch durch ST-1006 reguliert waren. Potentielle Zielstrukturen für diese Arbeit wurden unter denjenigen Genen ausgewählt, deren Regulation die höchste statistische Signifikanz aufwies. Aufgrund der bereits vielfach beschriebenen Implikation von IL-18 in die Pathogenese der AD wurde zuletzt die Entscheidung für eine tiefergehende Untersuchung von IL-18 und dem IL-18 Rezeptor (IL-18R) für die vorliegende Arbeit getroffen (Beyer et al., 2022).

1.4 IL-18 und IL-18 Rezeptor

IL-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin und gehört zur IL-1-Superfamilie (Lee et al., 2015). Ursprünglich wurde es 1989 für seine IFN- γ -induzierende Rolle als sogenannter „*IFN- γ -inducing factor*“ bekannt und erst später, 1995, mit seiner erfolgreichen molekularen Klonierung zu IL-18 umbenannt (Dinarello et al., 2013; Okamura et al., 1995). Tatsächlich vermittelt IL-18 in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu eine Vielzahl an Funktionen (Sanders und Mishra, 2016), wie in Abbildung 4 dargestellt ist. IL-18 kann von zahlreichen hämatopoetischen Zelltypen (z.B. APCs) und nicht-hämatopoetischen Zellen (z.B. Keratinozyten, Epithelzellen) gebildet werden (Sanders und Mishra, 2016). Diese synthetisieren Pro-IL-18 als inaktives Vorläufermolekül, welches für seine Aktivierung zu reifem IL-18 einer enzymatischen Spaltung (Caspase-1, Chymase, Granzyme B) bedarf (Yasuda et al., 2019).

IL-18 entfaltet seine Wirkung über den IL-18R, welcher der Familie der IL-1 Rezeptoren angehört. Er besteht aus einer induzierbaren Alpha-Kette, welche den Liganden bindet (IL-18R α , *IL-1 receptor related protein*), und einer konstitutiv exprimierten Beta-Kette (IL-18R β , *IL-1 accessory protein-like*) (Nakanishi et al., 2001). Bindet IL-18 an den IL-18R α , so heterodimerisiert er mit IL-18R β und bildet einen hochaffinen Rezeptorkomplex aus. Dieser ist

auf Immunzellen (siehe Abb. 2) und weiteren nicht-hämatopoetischen Zellen (z.B. Epithelzellen oder Nervenzellen) induzierbar (Yasuda et al., 2019).

IL-18R α bindet neben dem proinflammatorischen IL-18 einen weiteren Liganden, das antiinflammatorische Zytokin IL-37. Die Signaltransduktion von IL-37 erfolgt über einen heterodimeren Rezeptorkomplex mit IL-1R8 (Nold-Petry et al., 2015).

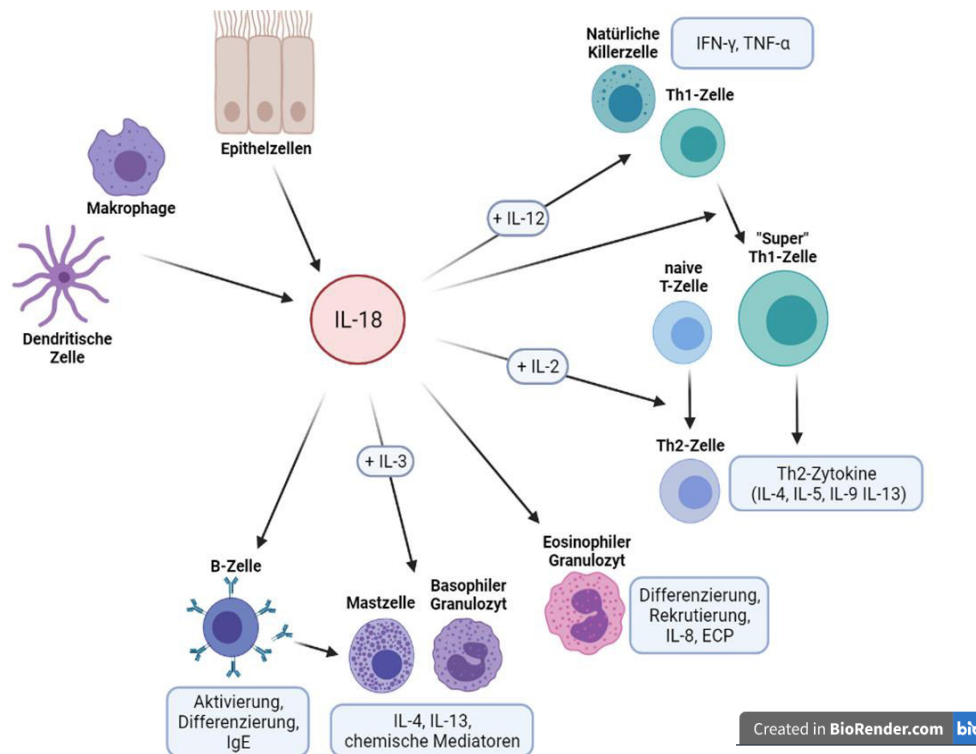


Abbildung 4: Pleiotrope Funktionen von IL-18

IL-18 ist ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen. Im Zusammenspiel mit IL-12 führt es über Th₁-Zellen und natürliche Killerzellen zu einer potenten IFN- γ - und TNF- α -Produktion (Robinson et al., 1997). In einem Zytokinmilieu mit IL-2 kann IL-18 auch die Produktion des Th₂-Zytokins IL-13 in naiven T-Zellen bewirken und ihre Differenzierung zu Th₂-Zellen anstoßen (Yoshimoto et al., 2000). Weiterhin hat IL-18 die Fähigkeit, in Th₁-Zellen die Produktion von Th₂-Zytokinen (IL-3, IL-9, IL-13) zu induzieren (Sugimoto et al., 2004). Diese Th₁-Zellen wurden im weiteren Verlauf von Terada et al. als „Super Th₁-Zellen“ bezeichnet (Terada et al., 2006). Auf Eosinophilen trägt IL-18 zur Differenzierung und Rekrutierung bei, wird mit einer gesteigerten Degranulation in Verbindung gebracht und induziert einen pathologischen Subtyp (Venkateshaiah et al., 2018; Verhaeghe et al., 2002). In Kombination mit IL-3 kann IL-18 unabhängig vom FC ϵ RI direkt auf basophilen Granulozyten und Mastzellen agieren und ihre Expression von IL-4, IL-13 und Histamin steigern (Nakanishi, 2018; Yoshimoto et al., 1999). Darüber hinaus stimuliert es auf B-Zellen den Isotypenwechsel zu IgE, welches wiederum das Ansprechen von Mastzellen und Basophilen auf Antigene erhöht (Sanders und Mishra, 2016).

1.4.1 Rolle von IL-18 und IL-18R in AD

Mehrere Untersuchungen legen eine Rolle von IL-18 und dem IL-18R in der AD nahe. Es ist bekannt, dass der Serum-Spiegel von IL-18 in AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht und mit dem SCORAD assoziiert ist (Tanaka et al., 2001). Weiterhin berichteten Inoue et al. über eine erhöhte IL-18 Expression in der Hornschicht der Hautläsionen sowie einer positiven Korrelation dieser zum SCORAD, Serum IgE, Serum-IL-18, zur Anzahl der Eosinophilen im Blut und zum transepidermalen Wasserverlust in AD-Patienten. Dabei schlussfolgerten die Autoren, dass die IL-18 Expression in der Hornschicht am wahrscheinlichsten auf die Keratinozyten zurückzuführen ist (Inoue et al., 2011). Die Auswirkungen des in der Hornschicht freiwerdenden IL-18 untersuchten Konishi et al. in einem transgenen Mausmodell mit Caspase-1-überexprimierenden Keratinozyten sowie Keratinozyten, die bereits reifes IL-18 sezernieren konnten. Beide Mauskohorten entwickelten spontan juckende, AD-ähnliche Hautläsionen und zeigten ohne vorherige Sensibilisierung oder Infektion einen Anstieg der Serum-IgE-Konzentrationen (Konishi et al., 2002). Die Freisetzung von IL-18 durch Keratinozyten in AD-Patienten scheint dabei beispielsweise durch eine *S. aureus* Kolonisation der Haut hervorgerufen zu werden (Inoue et al., 2011).

Trotz steigender Serum-IgE-Werte, die von Konishi et al. berichtet worden, sind erhöhte IL-18 Spiegel in AD-Modellen in der Mehrzahl mit niedrigen IgE-Spiegeln vergesellschaftet und weisen auf eine Rolle in der Pathogenese der intrinsischen Form einer AD hin (Inoue et al., 2011; Tanaka et al., 2001; Terada et al., 2006).

Auf immunologischer Ebene kann IL-18, wie in Abbildung 4 dargestellt ist, direkt auf verschiedene für die AD relevante Zellen einwirken und so über diverse Pfade die Entwicklung einer AD begünstigen (Sanders und Mishra, 2016). Die Regulation und die Expression des dafür erforderlichen IL-18R wurden im Zusammenhang mit inflammatorischen Hauterkrankungen allerdings bisher nur auf wenigen Zellen erforscht (Gutzmer et al., 2003; Hu et al., 2017; Wittmann et al., 2005).

1.4.2 Rolle von IL-18 und IL-18R auf Eosinophilen

Einer aktuellen Studie von Venkateshaiah et al. (2018) zufolge spielt IL-18 eine entscheidende Rolle in der Transformation von Eosinophilen in eine pathogene, CD101⁺ und CD274⁺ (PD-L1) exprimierende Untergruppe. Diese pathogenen Eosinophilen stellen sich durchflusszytometrisch wesentlich größer und granulierter als „normale“ IL-5 abgeleitete Eosinophile dar. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten außerdem, dass IL-18-differenzierte Eosinophile vermehrt degranulieren im Vergleich zu IL-5-abgeleiteten. CD101⁺ und CD274⁺ Eosinophile konnten im peripheren Gewebe von allergischen Erkrankungen wie Asthma und eosinophiler Ösophagitis nachgewiesen werden (Venkateshaiah et al., 2018).

Interessanterweise scheint die IL-18R α Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten niedriger als in gesunden Kontrollen zu sein, wie Hou et al. berichteten. Der Zusammenhang dafür ist bisher noch nicht aufgeklärt. Darüber hinaus fand die Arbeitsgruppe im Serum von AD-Patienten auch verringerte Spiegel an IL-37 im Vergleich zu gesunden Probanden, dem antiinflammatorischen Liganden des IL-18R α (Hou et al., 2021).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den Einfluss von Histamin und dem H₄R auf die Regulation und Expression von IL-18 und dem IL-18R auf humanen Eosinophilen in AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zu erforschen. Dafür sollen Untersuchungen auf mRNA-Ebene mittels PCR und auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und ELISA zur Anwendung kommen. Da ebenfalls der H₂R von Eosinophilen exprimiert wird, sollen weiterhin auch die durch ihn potenziell vermittelten Effekte mituntersucht werden. Vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse zur Funktion des H₄R auf Eosinophilen (partielle Aktivierung) soll weiterhin der regulative Einfluss von Histamin und dem H₄R auf den frühen Aktivierungsmarker CD69 näher charakterisiert werden. Ergänzend dazu werden Th₂- und Th₁-gerichtete Zytokine als Bestandteil des inflammatorischen Infiltrats einer AD Teil der Untersuchungen sein.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Kits (Baukästen)

Kits	Hersteller	Kat.-Nr.
Mini & Midi MACS™ Starting Kit (für 2.3.1)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG Bergisch Gladbach, Deutschland	74106
Rneasy® Mini Kit (für 2.3.4)	Qiagen GmbH Hilden, Deutschland	564675
QuantiTect® Reverse Transcription Kit (für 2.3.5)		205313
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (für 2.3.6)		204145
Human Total IL-18 DuoSet ELISA (für 2.3.8)	Bio-Techne GmbH (R&D Systems) Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	DY318-05
Human Ribonuclease 3 SimpleStep ELISA® Kit (ECP) (für 2.3.8)	Abcam Cambridge, UK	AB279415

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Puffer /Medium/Lösung		Hersteller	Kat.-Nr.
PBS (phosphate buffered saline)	900 ml Ampuwa®, 1000 ml Plastipur®	Fresenius Kabi GmbH Bad Homburg, Deutschland	1088813
	100 ml DPBS (10x), ohne Ca und Mg	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland	P04- 53500
Pancoll/Percoll (Dichte 1.08 g/ml)	500 ml Pancoll human, Dichte 1.077 g/ml	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) Darmstadt, Deutschland	P04- 60500
	30 ml Percoll pH 8.5-9.5 (20 °C), Dichte 1.13 g/ml		P1644
Erythrozyten- Lyse-Puffer	8 g NH ₄ Cl		A4514
	100 ml EDTA 1 mM		-
	10 ml KHCO ₃ 1 M		SAFS603 39
	890 ml Ampuwa®, 1000 ml Plastipur®	Fresenius Kabi GmbH Bad Homburg, Deutschland	1088813
FACS-Wasch- puffer	40 ml PBS	siehe 2.2.2 PBS	-
	2 ml MACS® BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG Bergisch Gladbach, Deutschland	130-091- 376
MACS Puffer	50 ml autoMACS® Rinsing Solution		130-091- 222
	250 ml MACS® BSA Stock Solution		130-091- 376
Reagent Diluent (für 96 Wells)	7 ml MACS® BSA Stock Solution		130-091- 376
	63 ml PBS	siehe 2.2.2 PBS	-

Kimura (für 34,6 ml)	22 ml Toluidin-Blau 0,05%		SERVA Elektrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland	36693,02
	1 ml Saponin		Merck KgaA (Sigma-Alderich) Darmstadt, Deutschland	S 7900
	4,5 g Kalium- hydrogenphosphat auf 500 ml Ampuwa®	Insg. 10 ml pH 6,4		
	4,75 g Di- Natriumhydrogen phosphat auf 500 ml Ampuwa®			S 0876
	1,6 ml Light Green 0,03%			L-1886
IF-Blockpuffer	1 ml NaN ₃ 2 M			S2002
	0,2 g Gelatine			48723
	20 ml humanes IgG (10 mg/ml)		Kedion Biopharma GmbH Gräfelfing, Deutschland	PZN: 07798107
	100 ml PBS		siehe 2.2.2 PBS	-
RLT-Puffer	50 ml Puffer RLT		siehe 2.2.1 Rneasy® Mini Kit	-
	500 µl β-Mercaptoethanol		Merck KgaA (Sigma-Alderich) Darmstadt, Deutschland	M6250
RPMI Complete (für 500 ml)	432,5 ml RPMI 1640, ohne L-Glutamine, mit 2.0 g/l NaHCO ₃		Bio&SELL GmbH (Fa. Biochrom) Feucht, Deutschland	F 1215
	5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 100x			K 0293
	2,5 ml Gentamycin			A 2712
	5 ml L-Glutamin			K 0282
	5 ml Penicillin/Streptomycin			A 2212
	50 ml fetales Rinderserum (hitzeinaktiviert)		Merck KgaA (Sigma-Alderich) Darmstadt, Deutschland	F 0804

2.1.3 Stimulanzen

Stimulans	Hersteller	Kat.-Nr.
Histamindihydrochlorid (Histamin-Rezeptor-Agonist)	ALK-Abelló Arzneimittel GmbH Hamburg, Deutschland	-
ST-1006 (H ₄ R-Agonist)	Univ.-Prof. Dr. h.c. Holger Stark Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland	-
JNJ7777120 (H ₄ R-Antagonist)	Merck KgaA (Sigma-Alderich) Darmstadt, Deutschland	J3770
R-(-)-α Methylhistamindihydrobromid (H ₃ R-Agonist)	Bio-Techne GmbH (Tocris Bioscience) Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	0569
Amthamindihydrobromid (H ₂ R-Agonist)		0668
Ranitidin (H ₂ R-Antagonist)		1967
Rekombinant Human IFN-γ Protein	Bio-Techne GmbH (R&D Systems)	285-IF-100
Rekombinant Human IL-4 Protein		204-IL-050

Rekombinant Human IL-5 Protein	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	205-IL-025
Rekombinant Human IL-13 Protein		213-ILB-100
Rekombinant Human IL-18 Protein		9124-IL050

2.1.4 Antikörper

FACS-Antikörper	Konzentration	Hersteller	Kat.-Nr.
FITC Mouse Anti-Human CD69	3 µl/50µl	BioLegend San Diego, CA, USA	555530
PE Mouse Anti-Human CD218a (IL-18Rα)	3 µl/50 µl	BD Biociences San Jose, CA, USA	564675
FITC Mouse Anti-Human CD274	3 µl/50 µl		558065
FITC Mouse IgG ₁ , κ Isotype Control	0,2 µl/50 µl		550616
PE Mouse IgG ₁ , κ Isotype Control	0,2 µl/50 µl		555749
7-AAD	1 µl/50 µl		51-68981E
Human TruStain FcX™	2 µl/50 µl	BioLegend San Diego, CA, USA	4223402
Magnetische Antikörper		Hersteller	Kat.-Nr.
CD16 MicroBeads human	-	Miltenyi Biotex B.V. & KG Bergisch Gladbach, Deutschland	130-045-701
CD2 MicroBeads human	-		130-091-114

2.1.5 Primer

Primer		Hersteller	Kat.-Nr.
Interleukin-18		Qiagen GmbH Hilden, Deutschland	QT00014560
Interleukin-18 Rezeptor			QT00082922
RPS20 (Ribosomales Protein S20)			QT00003290
RNase 2 (EDN)			QT00199731
RNase 3 (ECP)			QT00203224
Interleukin-37			QT00029904
CD274			QT00082775
Histamin-2 Rezeptor	H ₂ R forward	TIB Molbiol Berlin Berlin, Deutschland	1814234
	H ₂ R reverse		1814235
Histamin-4 Rezeptor	H ₄ R forward		1976517
	H ₄ R reverse		1976518

2.1.6 Labormaterialien

Pipetten und Zubehör	Hersteller	Kat.-Nr.
Multipipette® M4	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	4982000012
Multikanalpipette		613-0887
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001
Serologische Pipette 10 ml		86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml		86.1685.001
Biosphere® Fil. Tip 2,5 farblos		70.1130.212
Biosphere® Fil. Tip 20 farblos		70.1116.210
Biosphere® Fil. Tip 100		70.760.212
Biosphere® Fil. Tip 1000		70.3050.375
Pipettenspitze 200 µl		70.760.002
Pipettenspitze 1000 µl		70.762
epT.I.P.S.® Standard/Bulk 0,5-20 µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	0030 000.854
Pasteurpipette, Kalk-Soda-Glas, 150 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG Renningen, Deutschland	7691060
Pasteurpipette, Kalk-Soda-Glas, 230 mm		7691061
Tubes und Platten	Hersteller	Kat.-Nr.
CELLSTAR® centrifuge tube 15 ml, konischer Boden	Greiner Bio-One GmbH Frickenhäusen, Deutschland	188271
CELLSTAR® centrifuge tube 50 ml, konischer Boden		227261
CELLSTAR® centrifuge tube 50 ml, konischer Boden mit Stehrand		210261
Eppendorf™ PCR Tube 0,5 ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland	0030121023
Eppendorf™ Safe Lock Tube 1,5 ml		0030120086
Quali – Mikrozentrifugengefäße 0,6 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG Steinfurt, Deutschland	G051
Zellkulturplatte 96 Well	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland	83.3925.500
Light Cycler® 480 Multiwell Platte	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland	04729692001
Light Cycler® 480 Abdichtungsfolie		04729757001
Nunc Maxisorb ELISA Platte	Thermo Fisher Scientific Braunschweig, Deutschland	442404
Sonstige Gebrauchsmaterialien	Hersteller	Kat.-Nr.
50 ml BD Plastipak™ Spritze	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland	300865
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®	Merckle GmbH Blaubeuren, Deutschland	PZN- 03029820
Neubauer-improved Zählkammer	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG Bremen, Deutschland	5445836
RNase Away® (Dekontaminationslösung)	Thermo Fisher Scientific Braunschweig, Deutschland	7002

2.1.7 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Sicherheitswerkbank Labgard NU-437 Class II	INTEGRA Biosciences GmbH Biebertal, Deutschland
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH Biebertal, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Labofuge 400R	
Rotina 48 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttligen, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Sprout™ Plus Minizentrifuge	Biozym Diagnostik GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe Laboport® Mini KN	KNF Neuberger GmbH Freiberg in Breisgau, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH Göttingen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank -20°	
Gefrierschrank -80°C	Sanyo Denki Germany GmbH Eschborn, Deutschland
Brutschrank	Gesellschaft für Labortechnik GmbH Burgwedel, Deutschland
Wasserbad	
LightCycler® 480 (96-well)	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
FACSCanto II System	BD Biosciences San Jose, CA, USA
FLUOstar OPTIMA Mikroplatten Leser	BMD LABTECH GmbH Ortenberg, Deutschland
ELx50 FMW Mikroplatten Wascher	BioTek Instruments GmbH Bad Friedrichshall, Deutschland
Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland

2.1.8 Computerprogramme

Programm	Firma
Microsoft Excel 2010	Microsoft Cooperation Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2010	
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software San Diego, CA, USA
Kaluza Analysis 2.1	Beckman Coulter GmbH,

	Krefeld, Deutschland
BioRender.com	-
LightCycler® Software	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
RefWorks	-

2.2 Patientenkollektiv und Studiendesign

Für die experimentelle Untersuchung der Eosinophilen wurde venöses Vollblut von Patienten mit AD sowie von gesunden Probanden entnommen (Zeitraum: August 2020 bis Mai 2021). Die Gesamtanzahl der eingeschlossenen Probanden beträgt 57, davon waren 35 AD-Patienten und 22 gesunde Spender. Die AD-Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine systemische immunsupprimierende Therapie seit mindestens zwei Wochen. Der Schweregrad der Erkrankung wurde mittels SCORAD (*scoring atopic dermatitis*) erfasst. Insgesamt waren 9 Patienten mild von der AD betroffen (SCORAD < 25), 16 moderat (SCORAD 25-59) und 6 schwer (SCORAD > 60) (SCORAD bei 4 Patienten unbekannt). Das Durchschnittsalter der AD-Patienten lag bei 33,4 Jahren, unter den gesunden Probanden bei 29,3 Jahren. Alle Probanden wurden bezüglich der Teilnahme an der wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und willigten schriftlich in die Studienteilnahme ein. Die Durchführung der Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigt (Votum Nr. 4253) und erfolgte gemäß den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki.

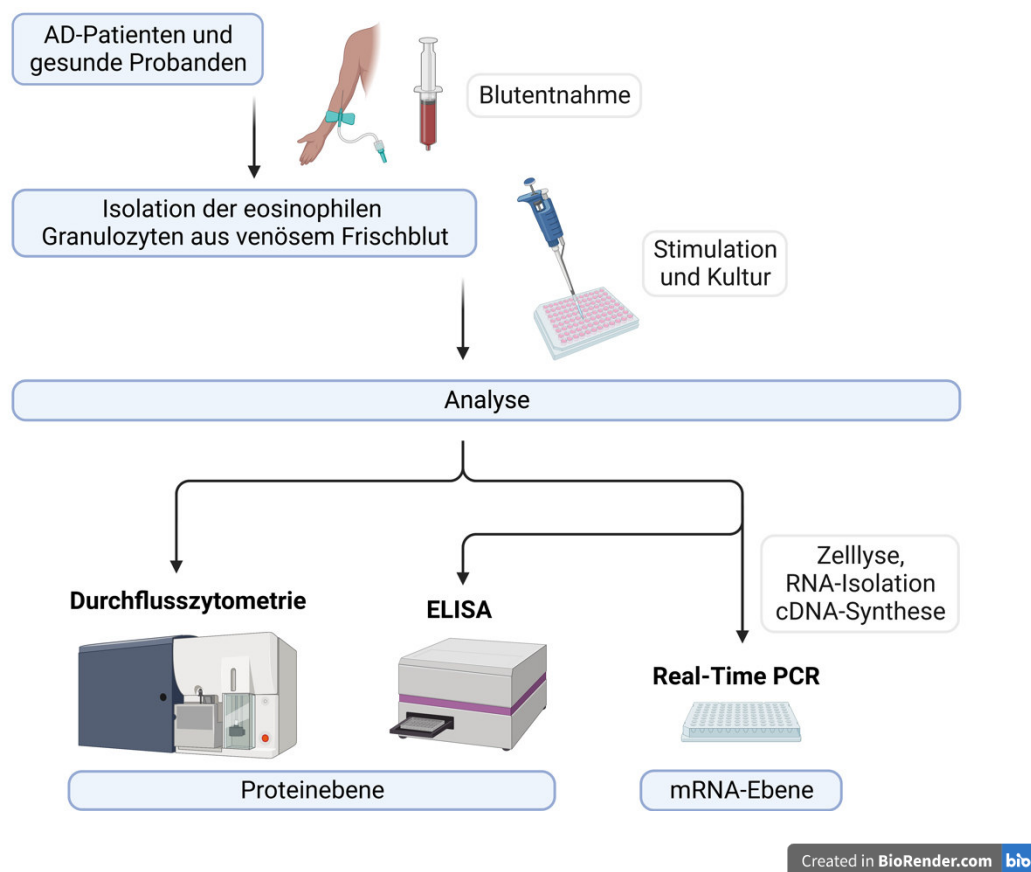


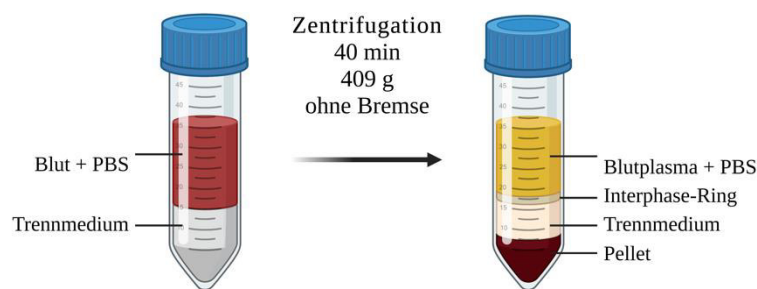
Abbildung 5: Studiendesign

In dieser Studie wurden isolierte eosinophile Granulozyten von AD-Patienten und gesunden Probanden mit Histamin, selektiven Histaminrezeptor-Agonisten/Antagonisten sowie weiteren AD-assoziierten Zytokinen kultiviert. Auf Proteinebene erfolgte die Analyse der Zellen und der Überstände mittels Durchflusszytometrie bzw. ELISA. Auf mRNA-Ebene wurden die Eosinophilen nach vorheriger Zelllyse, RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels Real-Time PCR untersucht.

2.3 Methoden

2.3.1 Isolation von eosinophilen Granulozyten aus Frischblut

Zur Isolation der Eosinophilen wurde gesunden Probanden sowie Patienten mit AD (siehe 2.2 Patientenkollektiv) 60 ml heparinisiertes Vollblut entnommen. Das entnommene Blut wurde anschließend 1:2 mit PBS verdünnt und auf die hydrophobe Trennlösung Pancoll/Percoll im Verhältnis 1:3 überschichtet. Durch eine 40-minütige Dichtegradientenzentrifugation bei 409 g, 20° C ohne Bremse trennte sich das Vollblut in verschiedene Schichten auf, dank derer Eosinophile zusammen mit den Erythrozyten und Neutrophilen von den restlichen Blutzellen (PBMcs, *peripheral mononuclear blood cells*) isoliert wurden (siehe Abb. 6).



Created in BioRender.com bio

Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist eine Methode zur Auftrennung der zellulären Bestandteile des Vollblutes gemäß ihrer Dichte. Durch das hydrophobe Trennmedium wird nach 40-minütiger Zentrifugation ein für die Extraktion von Eosinophilen optimaler Dichtegradient erzeugt. PBMcs finden sich aufgrund ihrer geringeren Dichte im Interphase-Ring. Eosinophile sowie Neutrophile und Erythrozyten sedimentieren im Pellet. Durch den Zusatz von Percoll zum Trennmedium Pancoll steigt die Dichte des Mediums auf 1,08 g/ml, wodurch eine Kontamination des Pellets durch basophile Granulozyten umgangen wird.

Nach der Zentrifugation wurde der Interphase-Ring sowie der azelluläre Überstand abgenommen. Für die hyperosmolare Lyse der Erythrozyten im Pellet wurden die Röhrchen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer auf 50 ml aufgefüllt, 6 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 6 min bei 600 g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Erythrozyten-Lyse ein weiteres Mal wiederholt. Zum Abschluss wurden die verbliebenen Granulozyten in zwei Waschschrten bei 350 g, 4 °C mit PBS aufgereinigt.

Zur Bestimmung der Zellzahl und des Anteils an Eosinophilen im vorliegenden Pellet wurde es, je nach Größe, in einem genauen Volumen von 2 bis 20 ml PBS aufgenommen. Aus der Zellsuspension wurden 10 µl mit dem Farbreagenz Kimura 1:10 verdünnt und davon wiederum 10 µl in eine Neubauer Zählkammer zur Zellzählung unter dem Mikroskop gegeben.

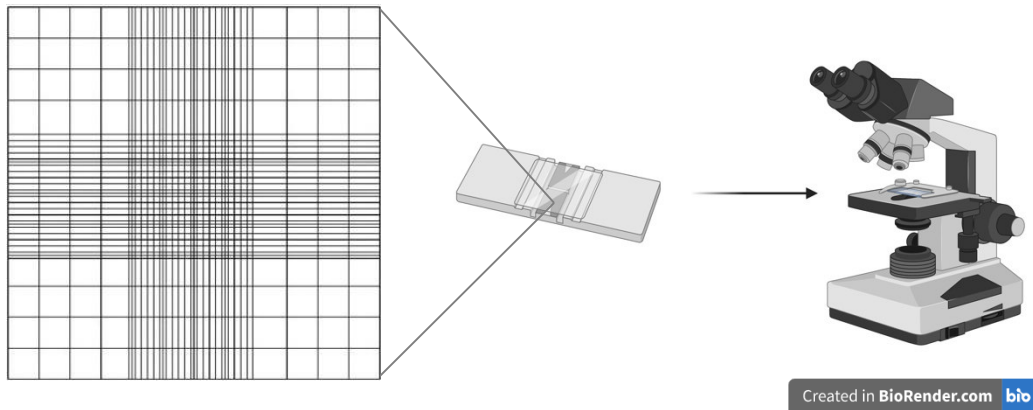


Abbildung 7: Zählkammer nach Neubauer zur quantitativen Bestimmung von Leukozyten

<https://www.zählkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>, abgerufen am 21.05.2021.

Modifizierung mit freundlicher Genehmigung von LO-Laboroptik.

Die Zellzählung mithilfe der Neubauer Zählkammer erfolgt in einem quadratischen Zählnetz. Das Zählnetz befindet sich in einer 0,1 mm flachen, genormten Vertiefung, in die von einem Deckglas bedeckt eine genormte Menge (10 µl) der gefärbten Zellsuspension pipettiert wird. Es setzt sich aus 9 Großquadraten à 1 mm² zusammen, die nochmals in 16 Kleinquadrate gegliedert sind. In den vier eckständigen Großquadraten findet die meanderförmige Zählung entlang der 16 Kleinquadrate statt. Die gezählte Zellzahl der vier Großquadrate wird zum Abschluss gemittelt.

Im Anschluss an das Zählen wurde mithilfe der folgenden Formel sowohl die Gesamtzellzahl als auch der Anteil an Eosinophilen der im PBS aufgenommenen Zellen näherungsweise berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen (ml)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}$$

Der Kammerfaktor ergibt sich aus der Berechnung des Volumens eines Großquadrates durch die Formel $\text{Fläche (1 mm}^2\text{)} \times \text{Tiefe (0,1 mm)} = \text{Volumen (0,1 mm}^3\text{ oder 0,1 µl)}$. Das Angleichen der Einheit von 0,1 µl auf 1 ml erfordert den Faktor 10⁴.

Zur weiteren Aufreinigung der Eosinophilen mittels magnetischer Zelltrennung wurde das MidiMACS™ Starting Kit verwendet. Pro 1 x 10⁷ Zellen wurden 10 µl CD16 MicroBeads und 10 µl MACS Puffer benötigt, in denen die Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert wurden. Aufgrund einer gelegentlichen Kontamination der Granulozyten mit Lymphozyten aus der Interphase wurde das Gemisch zusätzlich um 20 µl CD2 MicroBeads ergänzt. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer bei 350 g, 4 °C gewaschen und der Überstand mitsamt den ungebundenen Antikörpern entfernt. Das Pellet wurde in 500 µl MACS Puffer aufgenommen und über eine magnetische LS-Filtersäule gegeben (siehe Abb. 8). Nach und nach wurde die Säule mit

insgesamt 9 ml MACS-Puffer gespült und das Filtrat unterhalb der Säule aufgefangen. Im Anschluss an eine 6-minütige Zentrifugation des Filtrats bei 350 g, 4 °C und das Entfernen des Überstandes wurde das verbliebene Pellet je nach Größe in 1 bis 10 ml RPMI Complete aufgenommen. Zum Nachweis einer erfolgreichen Isolation der Eosinophilen wurden 20 µl Zellsuspension 1:2 mit Kimura gefärbt und nach obigem Schema in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. An dieser Stelle wurde abschließend die definitive Zellzahl an Eosinophilen sowie ihre Reinheit bestimmt. Für alle weiterverarbeiteten Proben galt eine Eosinophilenquote von mindestens 96%.

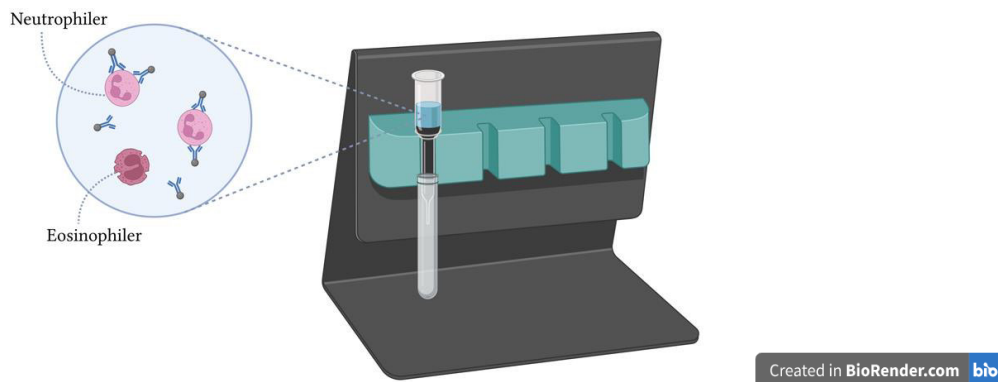


Abbildung 8: Magnetische Trennung der Eosinophilen von den Neutrophilen

CD16 MicroBeads sind mit nanomagnetischen Partikeln markierte Antikörper, die an das auf Neutrophilen exprimierte CD16 Antigen binden. Bei der Passage der Filtersäule werden Neutrophile durch das Magnetfeld des magnetischen MidiMACS™ Separators zurückgehalten. Nicht-markierte Eosinophile hingegen können in Form einer Negativselektion den Filter ungehindert passieren. Dasselbe Prinzip ist für die CD2 MicroBeads anzuwenden, die eine Negativselektion von Lymphozyten erzeugen.

2.3.2 Stimulation und Zellkultur

Die Kultivierung der in 2.3.1 isolierten Eosinophilen erfolgte in RPMI Complete auf einer 96-Well Rundboden-Platte bei 37 °C und 5 % CO₂. In Abhängigkeit von der Ausbeute und der Größe des Versuchsansatzes (Anzahl der Wells) wurden 2 bis 5 x 10⁵ Eosinophile in 200–250 µl Nährmedium ausplattiert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Stimulanzen, ihre Zielkonzentrationen und die im weiteren Verlauf analysierten Zielstrukturen auf mRNA-Ebene (Real-Time PCR) und Proteinebene (Durchflusszytometrie, ELISA).

2.3.3 Zelllyse und Überstandsextraktion

Für die Lyse und Überstandsextraktion der zuvor stimulierten und kultivierten Eosinophilen wurde die 96-Well-Platte bei 300 g, 20 °C für 3 min zentrifugiert und die 200-250 µl

Tabelle 1: Verwendete Stimulanzen und untersuchte Zielstrukturen

Stimulanzen	Zielkonzentration	Zielstruktur mRNA-Ebene	Zielstruktur Proteinebene
Histamin	10 μ mol/l	IL-18, IL-18R, EDN, ECP	IL-18, IL-18R, CD69
ST-1006		IL-18, IL-18R	IL-18, IL-18R, CD69
Amthamin		IL-18, IL-18R	IL-18, IL-18R, CD69
JNJ7777120		-	IL-18R
Ranitidin		-	IL-18R
IL-4	10 ng/ml	-	IL-18R, CD69
IL-5		-	IL-18R, CD69
IL-13		-	IL-18R, CD69
IL-18		EDN, ECP	IL-18R, CD69, ECP
Interferon- γ		EDN, ECP	IL-18R, CD69, ECP

Überstand pro Well abgenommen. Die Überstände wurden gesammelt und bei -80°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden sie für die Analyse der von den Eosinophilen freigesetzten Mediatoren mittels ELISA weiterverwendet.

Zur Weiterbearbeitung der Zellpellets wurden diese mit jeweils 200 μ l PBS bei 300 g, 20°C gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgenommen und die Zellen in jeweils 250 μ l RLT Puffer lysiert. Nach 5-10 min wurden die Proben kurz auf einem Vortexer durchmischt und zuletzt, ebenso wie die Überstände, bei -80°C eingefroren.

2.3.4 RNA-Isolation aus lysierten eosinophilen Granulozyten

Messenger RNA (mRNA) ist eine einzelsträngige RNA, die als Produkt aus der im Zellkern stattfindenden Transkription der doppelsträngigen DNA hervorgeht. Sie stellt das Ausgangsprodukt für die spätere Synthese von Proteinen dar. Die Expression und Regulation eines Gens (infolge eines Stimulus) zur Bildung des entsprechenden Proteins kann also anhand der mRNA Konzentration bestimmt werden.

Für die Isolation der zu verschiedenen Zeitpunkten exprimierten mRNA (kurz RNA) aus den Eosinophilen wurde das aufgetaute Eosinophilenlysat aus 2.3.3 weiterverwendet. Als Vorlage diente das Quick-Start Protocol aus dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Zur Vermeidung einer Kontamination der Proben mit ubiquitär vorkommenden RNA-spaltenden Enzymen (RNasen) wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter benutzt. Die Isolation selbst wurde unter einer mit der Dekontaminationslösung RNase Away® gereinigten Abzugshaube vorgenommen. Jede Probe (auf Eis gelagert) wurde zunächst mit 250 μ l 70%-igen Ethanol homogenisiert und im

selben Zug auf eine vorbereitete RNeasy Mini Spin Säule überführt. Das nach 15-sekündiger Zentrifugation bei 8000 g in den Sammelgefäßen aufgefangene Filtrat wurde verworfen. Für die optionale DNase Digestion wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säulen pipettiert und diese anschließend wieder bei 8000 g zentrifugiert und vom Filtrat befreit. Nach der Zugabe von 80 µl DNase I incubation mix direkt auf die Filtermembran jeder Säule und einer Inkubation für 15 min wurden die Säulen erneut gemäß der obigen Beschreibung mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Zwei Mal in Folge wurden sie dann mit 500 µl RPE Puffer befüllt, zentrifugiert (1. Runde 15 sek, 2. Runde 2 min) und von ihrem Filtrat befreit. Im letzten Schritt wurde die bis hier im Filter gefangene RNA eluiert. Dazu wurden 20-25 µl RNase freies Wasser auf die Filtermembran pipettiert, bei 8000 g für 1 min zentrifugiert und im Anschluss zügig bei -80 °C eingefroren, da RNA sehr fragil ist und andernfalls leicht zerfällt.

2.3.5 Umschreiben von RNA zu cDNA

Um für die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in 2.3.6 verwendbare Templates zu generieren, muss RNA zunächst in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben werden. Grund dafür ist, dass die *DNA-abhängigen* DNA-Polymerasen in der RT-PCR keine RNA, sondern ausschließlich DNA amplifizieren können, dafür aber wie *in vivo* ein hohes Maß an Effizienz und Fehlerfreiheit mit sich bringen.

Das Umschreiben erfolgte mithilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen. Es wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter benutzt und Oberflächen sowie Materialien vor der Nutzung mit RNase Away® gereinigt.

Das Umschreiben der RNA zu cDNA erfolgte in zwei Schritten, für die jeweils ein Mastermix vorbereitet wurde (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung der Mastermixe zum Umschreiben von RNA zu cDNA

Mastermix	Inhalt pro Probe
Mastermix 1: Elimination von gDNA	1,5 µl RNase freies Wasser
	1 µl DNA Wipeout Buffer
Mastermix 2: Reverse Transkription bzw. <i>no RT control</i>	0,5 µl Reverse Transkriptase (RT) bzw. RNase freies Wasser
	2 µl RT Buffer
	0,5 µl RT Primer Mix

Als erstes wurde die Elimination genomischer DNA (gDNA) vorgenommen. Dafür wurden jeweils 4,5 µl der aufgefrorenen RNA-Proben (auf Eis) mit 2,5 µl aus Mastermix 1 im Peltier Thermal Cycler bei 42 °C für 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben umgehend auf

Eis gelagert. Für die im zweiten Schritt folgende reverse Transkription der RNA zu cDNA wurden alle präinkubierten RNA-Proben 15 min in 3 µl aus Mastermix 2 bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit lagern sich die Primer an die RNA-Templates und die RT generiert die zur RNA komplementäre cDNA aus den in Überschuss vorliegenden Desoxynucleotid-Triphosphaten (dNTPs). Die Reaktion wurde schließlich durch die Denaturierung der RT bei 95 °C für 3 min beendet. Da eine Kontamination mit gDNA zu einer Veränderung der Amplifikationsprodukte der PCR-Zielstruktur(en) führen kann, wurde zum Ausschluss regelmäßig eine Negativkontrolle für die PCR mitgeführt. Hierfür wurde die Reverse Transkriptase in Mastermix 2 in einer einzelnen Probe durch RNase freies Wasser ersetzt (*no RT control*). Ohne Enzym kann keine cDNA entstehen und nur kontaminierende gDNA könnte der PCR so als Template dienen.

Um das Gelingen der Reaktionen in den Heizblöcken sicherzustellen, wurden die verwendeten Reaktionsgefäße vor den Inkubationsschritten kurz zentrifugiert. Die generierte cDNA wurde bei -80 °C eingefroren.

2.3.6 Real-Time PCR

Zur Quantifizierung der cDNA und zum Rückschluss auf die Expression und Regulation eines Gens wurde die quantitative RT-PCR genutzt. Sie stellt hierfür die sensitivste und zuverlässigste Methode dar und basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Standard-PCR. Eine PCR ist in drei Schritte à ca. 1 min zu untergliedern, die in mehreren Zyklen hintereinander ablaufen. Im ersten Schritt wird das DNA-Material bei 95 °C denaturiert und in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Im zweiten Schritt hybridisieren spezifische Primer mit dem 3'-Ende der zu untersuchenden Gensequenz/en (primerabhängige Annealing-Temperatur von 55 -65 °C). Im dritten und letzten Schritt erfolgt bei 72 °C die DNA-Synthese durch DNA-abhängige, thermostabile DNA-Polymerasen („Taq-Polymerasen“). Dieser Vorgang repetiert sich im Durchschnitt 20-30 Mal und die DNA-Abschnitte werden je nach Menge des Ausgangsmaterials verschieden stark amplifiziert.

Während bei der Standard-PCR zum Ende der Messung die DNA-Menge bestimmt wird, wird diese bei der RT-PCR in „Echtzeit“ nach jedem einzelnen Zyklus registriert. Dazu wird ein spezielles Gerät (Fluoreszenzphotometer) benötigt, welches Fluoreszenzsignale messen kann. Durch den Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green®, der die kleine Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert, kommt es am Ende des dritten Schrittes (= Ende eines Zyklus) zur Emittierung von Licht. Die Quantität der cDNA wird in der RT-PCR aus der Anzahl der Zyklen bis zum Überschreiten des Signals einer bestimmten Signalschwelle, dem sog. „threshold cycle (C_t)“ oder „crossing point (CP)“, bestimmt (siehe Abb. 9).

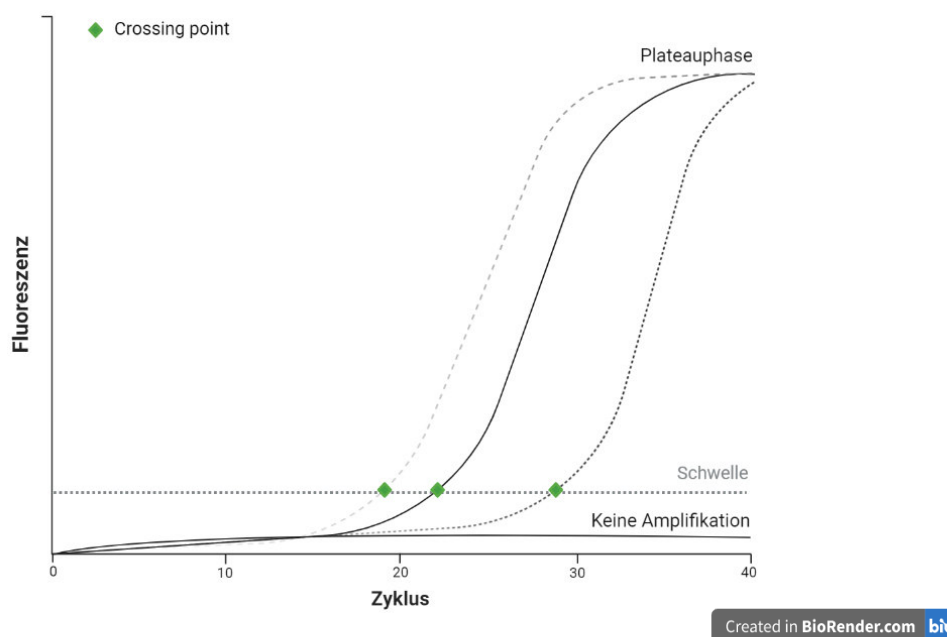


Abbildung 9: Schematische Amplifikationskurve einer quantitativen Real-time PCR

Während der ersten Zyklen der RT-PCR erhöht sich die Anzahl der DNA-Amplifikate nur sehr langsam. Abhängig von der Expression der Zielstruktur überschreiten sie durch das fortwährende, exponentielle Wachstum rund um den 20. Zyklus den *crossing point* (CP). Das Verhältnis zwischen den CPs verschiedener cDNA-Proben zeigt die Unterschiede in der Expression an. Eine Kontamination durch gDNA kann in der *no RT control* durch Einsetzen eines Fluoreszenzsignals identifiziert werden. Normalerweise findet hier keine Amplifikation statt. Außerdem wurde eine weitere Negativkontrolle in Form von Wasser mitgeführt (*no template control*).

Für die Durchführung der RT-PCR wurden die benötigten Einzelkomponenten, mit Ausnahme der cDNA, in Mastermixen angesetzt. Jeder Mastermix wurde je nach Ziel-Gen bzw. Referenz-Gen mit dem jeweils spezifischen Primer vorbereitet.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines PCR-Mastermixes

Mastermix	Inhalt pro Probe		
	5 µl SYBR Green®	1 µl Primer	3 µl RNase freies Wasser

Bei dem „Ribosomalen Protein S20“ (RPS 20) handelt es sich um ein Referenzgen, welches aufgrund seiner Rolle in der ribosomalen Translation konstitutiv exprimiert ist. Um eine Aussage über die variable Regulation und Expression der Ziel-Gene treffen zu können, wird für deren Quantifizierung ein relativer Mengenvergleich mit dem Referenz-Gen vorgenommen.

Auf einer PCR Multiwell Platte wurde schließlich 1 µl cDNA-Probe zu 9 µl des jeweiligen Mastermixes pipettiert und mit einer Abdichtungsfolie luftdicht versiegelt. Vor Beginn der

Programs

Program Name pre-incubation							
Cycles	1	Analysis Mode None					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:05:00	4,40		0	0	0
Program Name amplification							
Cycles	45	Analysis Mode Quantification					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4,40		0	0	0
55	None	00:00:10	2,20		0	0	0
72	Single	00:00:10	4,40		0	0	0
Program Name melting curve							
Cycles	1	Analysis Mode Melting Curves					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4,40		0	0	0
65	None	00:01:00	2,20		0	0	0
97	Continuous		0,11	5	0	0	0
Program Name cooling							
Cycles	1	Analysis Mode None					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2,20		0	0	0

Abbildung 10: Programmablauf der RT-PCR im LightCycler® 480

Die RT-PCR verläuft in 45 Amplifikations-Zyklen, die durch einen Präinkubationszyklus eingeleitet und durch das Erstellen der Schmelzkurven sowie der Abkühlung beendet werden. Die Schmelzkurven der einzelnen DNA-Proben werden durch eine spezifische Temperatur charakterisiert, bei der die doppelsträngigen DNA-Amplifikate dissoziieren. Jede untersuchte DNA-Sequenz hat aufgrund ihrer individuellen Abfolge an Basenpaaren eine spezifische Schmelztemperatur und kann so von anderen Zielstrukturen unterschieden werden. Die Beurteilung der Schmelzkurven ist Teil der Auswertung in der LightCycler® 480 Software.

Messung im LightCycler® 480 (siehe Abb. 10) wurde die Platte 1 min bei 300 g, 4 °C zentrifugiert und kühl auf Eis gelagert. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der LightCycler® 480 Software und die graphische Darstellung der Ratios (Zielstruktur/RPS 20) über GraphPad Prism.

2.3.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Zellzählung und der Analyse von Größe, Form und Eigenschaften individueller Zellen aus einer Zellsuspension. Eine zu analysierende Probe wird im Durchflusszytometer hydrodynamisch fokussiert und durch einen sich verjüngenden Kanal in eine Mikrokanalküvette geleitet. Hintereinander aufgereiht passieren die Zellen („Events“) der Probe in der Küvette einen Laserstrahl („*interrogation point*“), dessen Licht bei der Passage in verschiedene Richtungen gestreut wird. Das nach vorne gestreute Licht, genannt *forward scatter* (FSC), gibt dann Aufschluss über die Größe einer Zelle (FSC ~ Volumen). Das zur Seite gestreute Licht wiederum, genannt *side scatter* (SSC), erlaubt Rückschlüsse auf die Oberflächenbeschaffenheit und Granularität einer Zelle (SSC ~ Struktur).

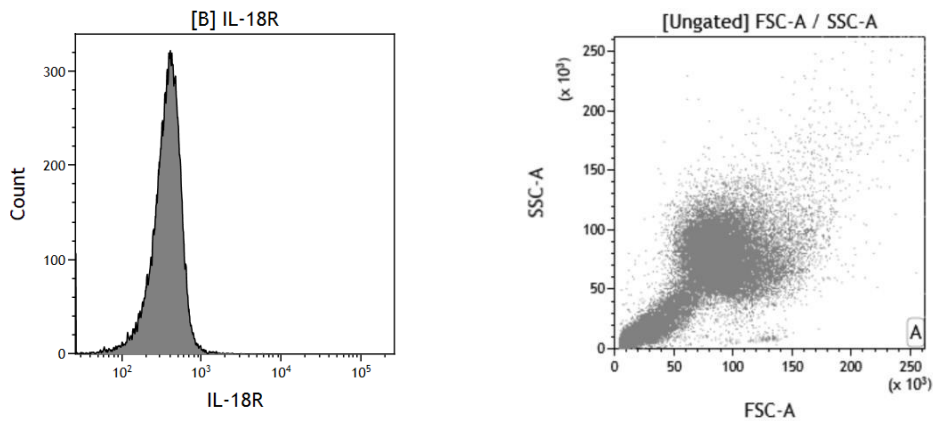


Abbildung 11: Histogramm und Punktdiagramm

Die Intensität des von den Events gestreuten Lichts wird von Photodetektoren gemessen und in ein elektrisches Signal (Spannung/Zeit) umgewandelt. Diese Informationen können von einem Computerprogramm u.a. in Form eines eindimensionalen Histogramms (links) oder zweidimensionalen Punktdiagramms (rechts) dargestellt werden.

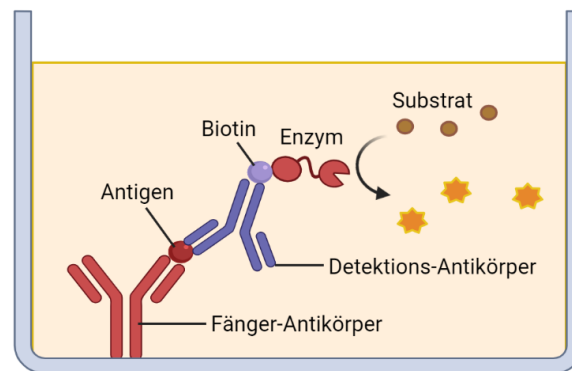
Weitere Eigenschaften über die Zellen lassen sich in Abhängigkeit von der Anzahl der im Gerät vorliegenden Laser durch eine vorherige Inkubation mit Fluoreszenzstoff-markierten Antikörpern ermitteln. Die Antikörper binden spezifisch an auf der Zelloberfläche exprimierten Antigenen. Bei der Passage der Küvette werden die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe durch die korrekte Wellenlänge des Laserstrahls angeregt und emittieren Licht. Dieses wird durch Emissionsfilter hindurch abgelenkt, die das Licht in seine verschiedenen Farben aufschlüsseln und so Rückschlüsse auf die Expression der Oberflächenmoleküle ermöglichen.

Für die Vorbereitung der Zell-Färbung wurden die in 2.3.2 für 20 h stimulierten Eosinophilen mit 250 µl PBS bei 300g, 4 °C gewaschen und 10 min in 50 µl IF Blockpuffer mit 2 µl Human TruStain inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei 4 °C im Dunklen mit 3 µl des entsprechenden Antikörpers (Anti-Human CD69/Anti-Human IL-18Rα) sowie 1 µl des Lebend-Tot-Farbstoffs 7-AAD inkubiert. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungsstellen von den als spezifisch geltenden Antikörpern wurde jeweils eine Kontrollprobe mit dem nicht-spezifischen Isotyp angefertigt. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl FACS-Waschpuffer bei 300 g, 4 °C wurden die Zellen in 240 µl Waschpuffer aufgenommen und im Durchflusszytometer FACSCanto II System analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Kaluza Analysis Software (näheres ab 3.2.2), die graphische Darstellung der relativen Zellzahl (%) und des MFI (*mean fluorescence intensity*) über GraphPad Prism.

2.3.8 ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein Immunassay und dient ebenso wie die Durchflusszytometrie dem Nachweis von Proteinen. Das grundlegende Prinzip eines Immunassays liegt in der Detektion eines in Flüssigkeit vorliegenden Analyts (Antigen) mithilfe

von Detektions-Antikörpern (*Detection-Antibody*, DAB). Die Bindung der DAB führt je nach vorliegender Konzentration der Zielstruktur zu einer unterschiedlich starken Farbreaktion in der Flüssigkeit. Die Farbintensität lässt sich in Form der optischen Dichte mit einem Lesegerät (Photometer) messen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt der Vergleich der Werte mit einer Standardkurve, deren Konzentrationsabstufungen bekannt sind. In Abbildung 12 sind die Einzelheiten über den Ablauf eines Sandwich ELISA beschrieben.



Created in BioRender.com 

Abbildung 12: Prinzip des direkten Sandwich ELISA

Modifiziert nach „ELISA (5. Streptavidin binds to biotin)“ von BioRender.com (2021).

Abgerufen: <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Das Trägermaterial (96-Well Mikrotiterplatte) für den ELISA wird mit dem sog. Fänger-Antikörper (*Capture-Antibody*, CAB) beschichtet, an den nach Zugabe der Proben das passende Antigen der Lösung bindet. Anschließend wird der Biotin-konjugierte Detektions-Antikörper (*Detection-Antibody*, DAB) hinzugegeben und detektiert die bereits gebundenen Antigene unter Bildung eines „Sandwiches“. Zuletzt erfolgt die Zugabe des Enzym-gekoppelten Substrats. Sobald das Enzym an das Biotin des DAB eines Sandwiches bindet, wird das Substrat enzymatisch gespalten. Dieser Vorgang wird durch den Farbumschlag der Flüssigkeit sichtbar.

Für die Durchführung des ELISA diente das Herstellerprotokoll des jeweiligen Kits (siehe 2.1.1) als Vorlage. Zur Immobilisation des in PBS angelösten CAB (Konzentration 2 µg/ml) auf der Trägerplatte wurden 100 µl in jedes Well pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde die Platte mit einem ELx50 Mikroplatten Wascher gewaschen und es wurden verbliebene Bindungsstellen auf den Oberflächen der Wells mit jeweils 300 µl Reagent Diluent (RD) blockiert. Nach einer einstündigen Inkubation erfolgte ein erneuter Waschgang. Pro Well wurden dann 50 µl Probe sowie in zwei freigelassenen Spalten 50 µl des nach Herstellerangaben in RD angesetzten Standards aufgetragen. Wieder wurde die Platte nach 2 h Inkubation gewaschen. Schließlich wurden 200 µl des in RD gelösten DAB (Konzentration 500 ng/ml) zu jedem Well mit Probeinhalt pipettiert und 2 h darin auf einem Taumelschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut gewaschen und 20 min mit jeweils 100 µl des Substrats

Streptavidin, gekoppelt an das Enzym Meerrettichperoxidase (kurz Streptavidin-HRP), auf einem Taumelschüttler inkubiert. Die Platte wurde dann ein letztes Mal gewaschen. Durch die Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Well wurde eine sich entwickelnde, blaue Farbreaktion ausgelöst. Mit 50 µl Schwefelsäure wurde diese Reaktion nach 20 min beendet und ein Farbumschlag ins Gelbe herbeigeführt. Die Messung erfolgte am FLUOstar OPTIMA Lesegerät.

2.4 Statistische Analysen

Alle graphischen Darstellungen und statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 5 angefertigt.

Als erstes wurde überprüft, ob die Werte normalverteilt sind. Dazu wurden kombiniert der Kolmogorov-Smirnov Test, der D'Agostino-Pearson Test und der Shapiro-Wilk Test verwendet. Für *nicht-normalverteilte* Stichproben erfolgte die anschließende Berechnung der Unterschiede zwischen zwei gepaarten Gruppen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Bei zwei ungepaarten Gruppen wurden die Unterschiede mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

Für *normalverteilte* Stichproben wurde der gepaarte t-Test bei zwei Gruppen verwendet.

Für alle Berechnungen wurde ein 95%-Konfidenzintervall festgelegt. Ein p-Wert < 0,05 wurde demnach als statistisch signifikanter Unterschied gewertet. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt graphisch dargestellt: p-Wert < 0,05 = *; p-Wert < 0,01 = **; p-Wert < 0,001 = ***.

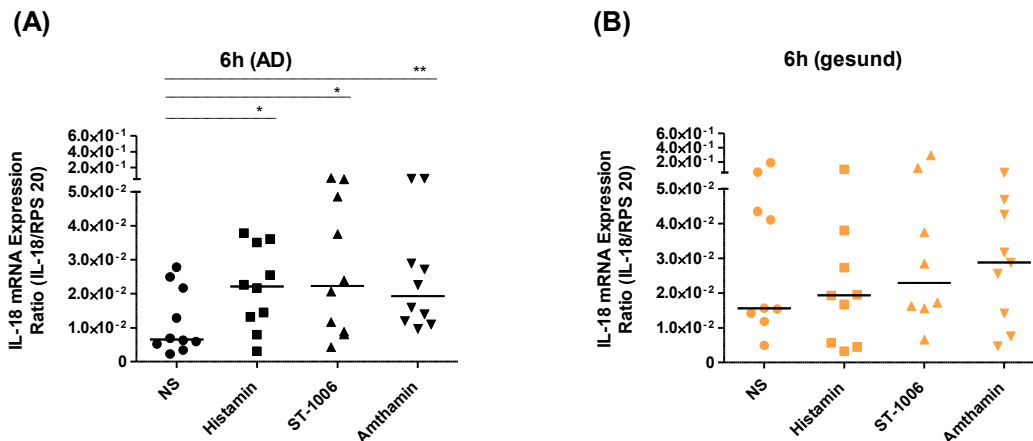
3 Ergebnisse

Humane eosinophile Granulozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und Negativselektion aus venösem Vollblut von AD-Patienten und gesunden Kontrollen isoliert. Die Reinheit der Eosinophilen wurde mikroskopisch bestimmt und betrug immer > 96%. Die Analyse der in verschiedenen Stimuli kultivierten Eosinophilen erfolgte auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und ELISA (siehe 2.2, Abb. 5). Insgesamt wurden 35 Patienten mit AD und 22 gesunde Probanden eingeschlossen. Das Alter zwischen den beiden Gruppen war vergleichbar. Der Schweregrad der AD wurde mittels SCORAD bestimmt. Von den AD-Patienten waren 9 Patienten mild, 16 moderat und 6 schwer betroffen (Schweregrad bei 4 Patienten unbekannt).

3.1 Untersuchungen zu IL-18

3.1.1 Histamin induziert die Hochregulation der IL-18 mRNA Expression über den H₄R und H₂R in AD-Patienten

Eosinophile von AD-Patienten zeigten nach 6 h Inkubation eine signifikante Hochregulation der IL-18 mRNA Expression in den Histamin-stimulierten Proben im Vergleich zu den nicht-stimulierten Proben (NS). Der H₄R-Agonist ST-1006 und der H₂R-Agonist Amthamin vermittelten einen korrespondierenden Effekt zu Histamin. Die Effektstärke zwischen den ST-1006- und Histamin-stimulierten Proben war im Median vergleichbar. Amthamin hingegen führte zu einem geringfügig schwächeren Effekt. Nach 24 h Inkubation wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten Proben und NS gefunden (Abb. 13 A und C). Bei den gesunden Probanden konnte weder nach 6 h, noch nach 24 h Inkubation ein signifikanter Unterschied in der IL-18 mRNA Expression zwischen den stimulierten Proben und NS festgestellt werden (Abb. 13 B und D). Der Vergleich der NS-Proben von gesunden Probanden und AD-Patienten zeigte eine signifikant niedrigere Basisexpression der IL-18 mRNA in Eosinophilen von Patienten mit AD (Abb. 13E).



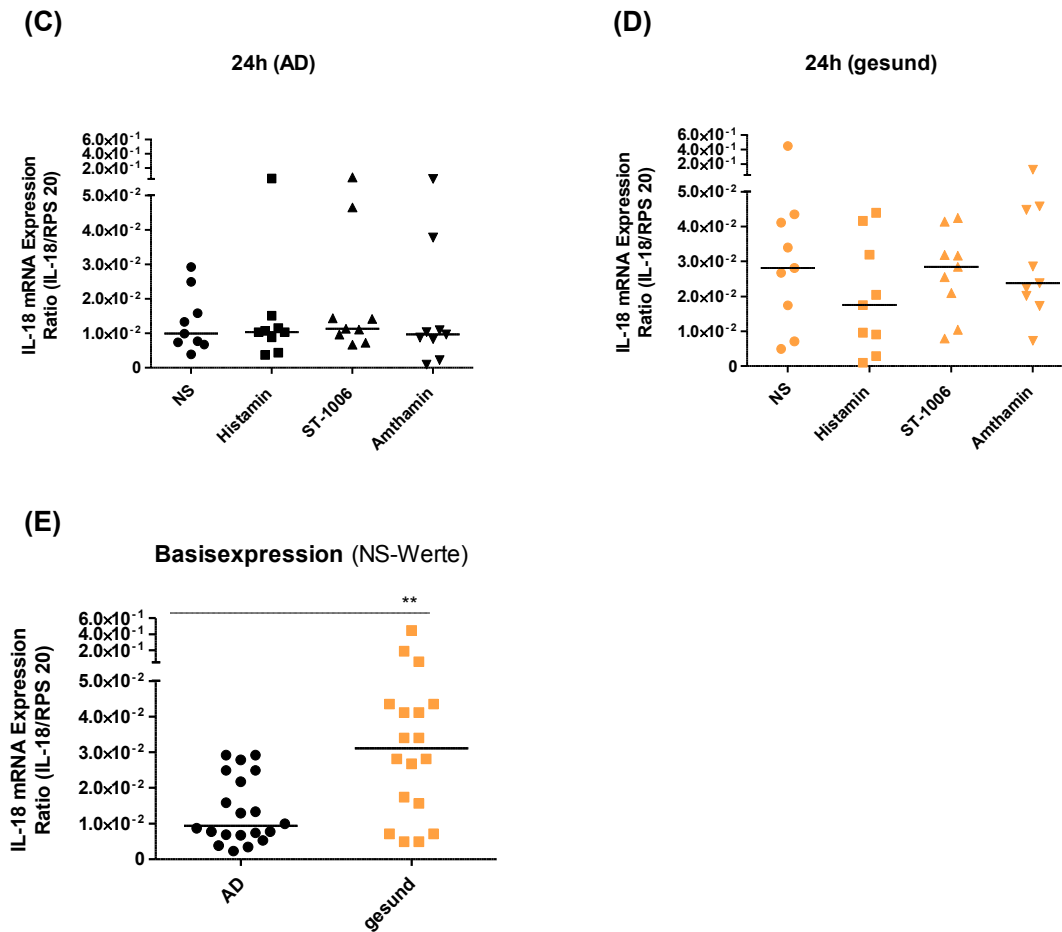


Abbildung 13: Histamin induziert die Hochregulation der IL-18 mRNA Expression über den H_4R und H_2R in AD-Patienten

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz, $n = 10$) und gesunden Probanden (orange, $n = 9$) wurden mit Histamin ($10 \mu\text{mol/l}$), ST-1006 ($10 \mu\text{mol/l}$) und Amthamin ($10 \mu\text{mol/l}$) für 6 h (A-B) oder 24 h (C-D) stimuliert. (E) In der Basisexpression sind alle untersuchten, nicht-stimulierten Proben aufgeführt. Die IL-18 mRNA Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt und ist im Median angezeigt. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede der gepaarten Stichproben mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet (A-D). Für E wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt.

3.1.2 IL-18 Protein Expression im ELISA nicht nachweisbar

Für die Untersuchung von IL-18 auf Proteinebene wurden zwei ELISA mit dem Human Total IL-18 DuoSet Kit durchgeführt. Dazu wurden die Überstände von den Histamin-, ST-1006- und Amthamin-stimulierten Proben sowie NS-Proben aus 3.1.1. verwendet. Das IL-18 Protein konnte im überwiegenden Teil dieser Proben nicht nachgewiesen werden, da die Messwerte unterhalb

des niedrigsten Standards von 11,7 pg/ml lagen (Daten nicht gezeigt). Die Validierung der Ergebnisse von mRNA-Ebene blieb damit aus.

3.1.3 IL-18 mRNA Induktion durch Histamin korreliert im Trend mit Anteil an Eosinophilen im Blut und SCORAD

Die gemessene IL-18 mRNA Induktion durch Histamin nach 6 h zeigte im Trend eine positive Korrelation mit dem Anteil an Eosinophilen im Blut von AD-Patienten und Gesunden ($p = 0,166$; $r = 0,426$) (Abb. 14A). Weiterhin korrelierte das Ausmaß der IL-18 mRNA Induktion positiv mit dem erfassten SCORAD der AD-Patienten ($p = 0,139$; $r = 0,571$) (Abb. 14B).

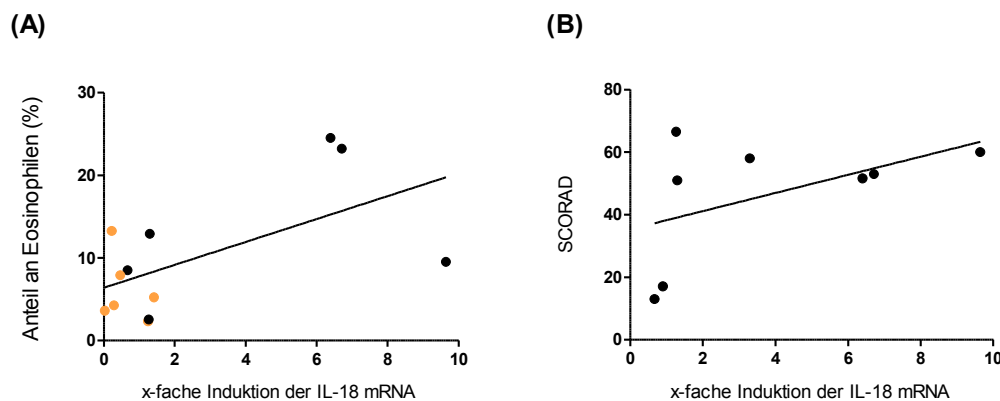


Abbildung 14: IL-18 mRNA Induktion durch Histamin korreliert im Trend mit Anteil an Eosinophilen im Blut und SCORAD

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Histamin für 6 h stimuliert. Die IL-18 mRNA Expression wurde im Vergleich von Histamin zu NS mittels RT-PCR analysiert (siehe Abb. 13 A-B). Der Quotient aus Histamin/NS wurde als x-fache Induktion der IL-18 mRNA mit dem mikroskopisch bestimmten Anteil an Eosinophilen im Blut und dem SCORAD korreliert. Für die statistische Analyse wurde die Rangkorrelation nach Spearman berechnet.

3.1.4 Unveränderte IL-37 mRNA Expression in Histamin-stimulierten Eosinophilen von AD-Patienten

Neben der IL-18 mRNA Expression wurde in den gesammelten Proben von 3.1.1 auch die IL-37 mRNA Expression bestimmt. IL-37 bindet an den IL-18R α , gilt als antiinflammatorischer Gegenspieler von IL-18 und weist eine erniedrigte Konzentration in Serum und Hautläsionen von AD-Patienten auf (Hou et al., 2021). Dazu wurden diejenigen Proben ausgewählt, die nach 6-stündiger Stimulation mit Histamin eine deutliche IL-18 mRNA Induktion aufwiesen. IL-37 war auf mRNA-Ebene in Eosinophilen von AD-Patienten und gesunden Kontrollen regelmäßig detektierbar. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Histamin-

stimulierten Proben im Vergleich zu NS in AD-Patienten und gesunden Probanden gefunden werden. Ähnlich dazu führten auch der H₄R-Agonist ST-1006 und der H₂R-Agonist Amthamin zu keinem Unterschied in der IL-37 mRNA Expression im Vergleich zu NS.

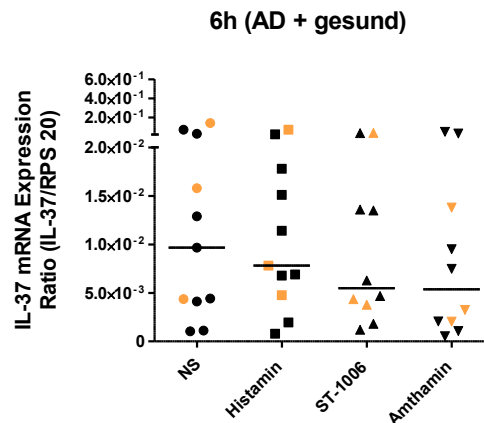


Abbildung 15: Unveränderte IL-37 mRNA Expression in Histamin-stimulierten Eosinophilen von AD-Patienten

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz, n = 8) und gesunden Probanden (orange, n = 3) wurden mit Histamin (10 µmol/l), ST-1006 (10 µmol/l) und Amthamin (10 µmol/l) für 6 h stimuliert. Die IL-37 mRNA Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt und ist im Median angezeigt. Für die statistische Analyse der Unterschiede der gepaarten Stichproben mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet, mit welchem sich keine signifikanten Ergebnisse ergaben.

3.2 Untersuchungen zum IL-18R

3.2.1 Histamin induziert die Hochregulation der IL-18R mRNA Expression über den H₄R und H₂R in AD-Patienten

Parallel zu den Untersuchungen von IL-18 überprüften wir außerdem die Expression und Regulation vom IL-18Rα auf Eosinophilen.

Auf mRNA-Ebene zeigten Eosinophile von AD-Patienten nach der Stimulation mit Histamin für 6 h eine signifikante Hochregulation der IL-18Rα mRNA Expression im Vergleich zu NS. Der H₂R-Agonist Amthamin führte zu einer korrespondierenden Hochregulation und übertraf den Histamineffekt. Bei dem H₄R-Agonisten ST-1006 ließ sich im Vergleich zu NS kein signifikanter Unterschied beobachten (Abb. 16A). Nach 24-stündiger Inkubation hingegen führte ST-1006 zu einer signifikanten Induktion der IL-18Rα mRNA in AD-Patienten, während bei der Stimulation mit Histamin und Amthamin nur eine Tendenz zur Hochregulation beobachtet werden konnte (Abb. 16C). Bei gesunden Probanden ließ sich weder nach 6 h, noch nach 24 h Inkubation ein signifikanter Unterschied beobachten (Abb. 16 B und D). Entsprechend der IL-18 mRNA Basisexpression wurde auch beim IL-18Rα eine signifikant niedrigere mRNA-Basisexpression in AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden festgestellt (Abb. 16E).

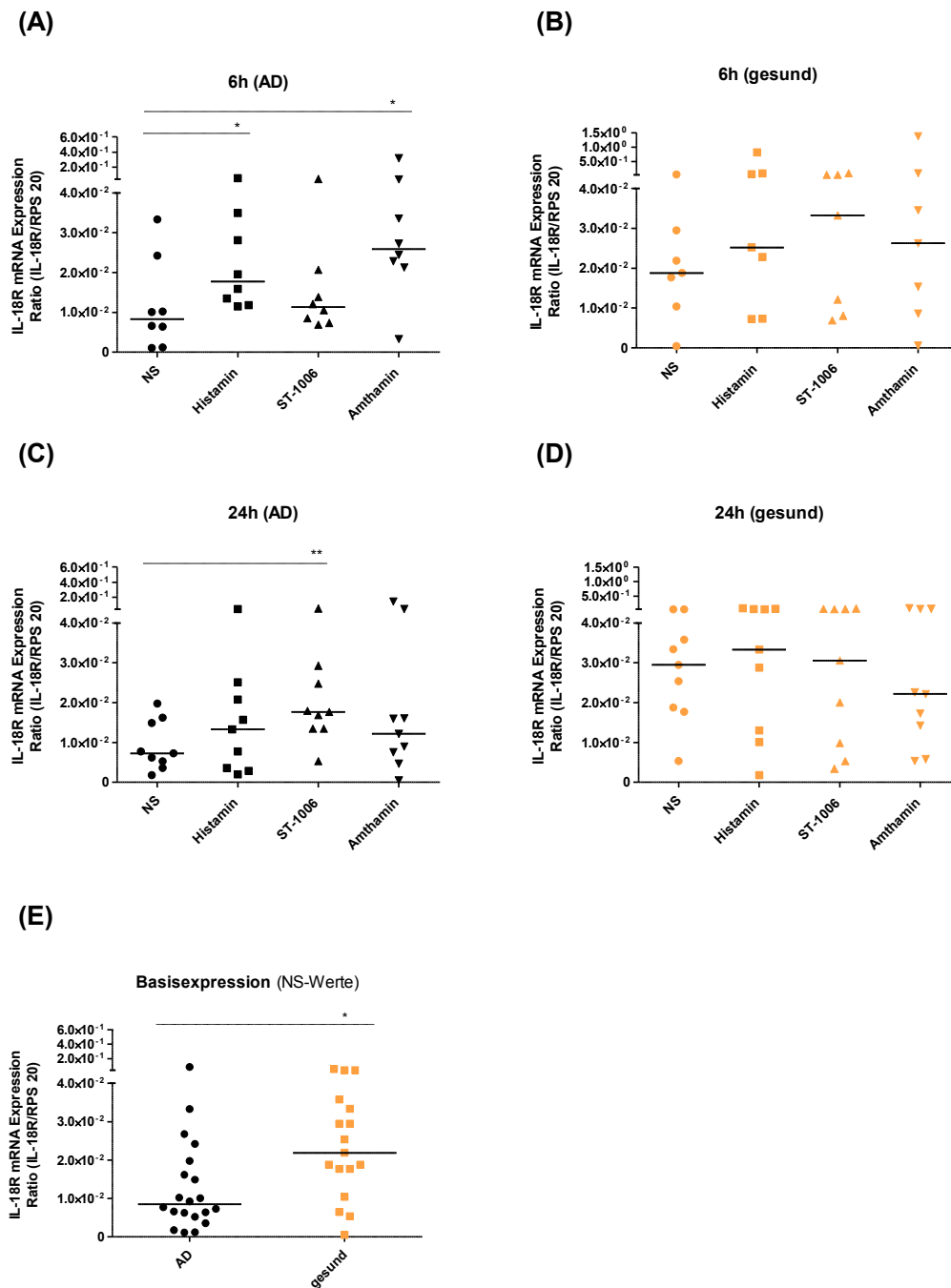


Abbildung 16: Histamin induziert die Hochregulation der IL-18R α mRNA Expression über den H₄R und H₂R in AD-Patienten

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz, n = 10) und gesunden Probanden (orange, n = 9) wurden mit Histamin (10 μ mol/l), ST-1006 (10 μ mol/l) und Amthamin (10 μ mol/l) für 6 h (A-B) oder 24 h (C-D) stimuliert. (E) In der Basisexpression sind alle untersuchten, nicht-stimulierten Proben aufgeführt. Die IL-18R α mRNA Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt und ist im Median angezeigt. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede der gepaarten Stichproben mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet (A-D). Für E wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt.

3.2.2 Histamin vermittelt die Hochregulation der IL-18R α Expression über den H₂R auf Proteinebene

Die Untersuchung der IL-18R α -Kette auf der Zelloberfläche von Eosinophilen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. In Abbildung 17 ist zunächst die Gating Strategie für den IL-18R α dargestellt.

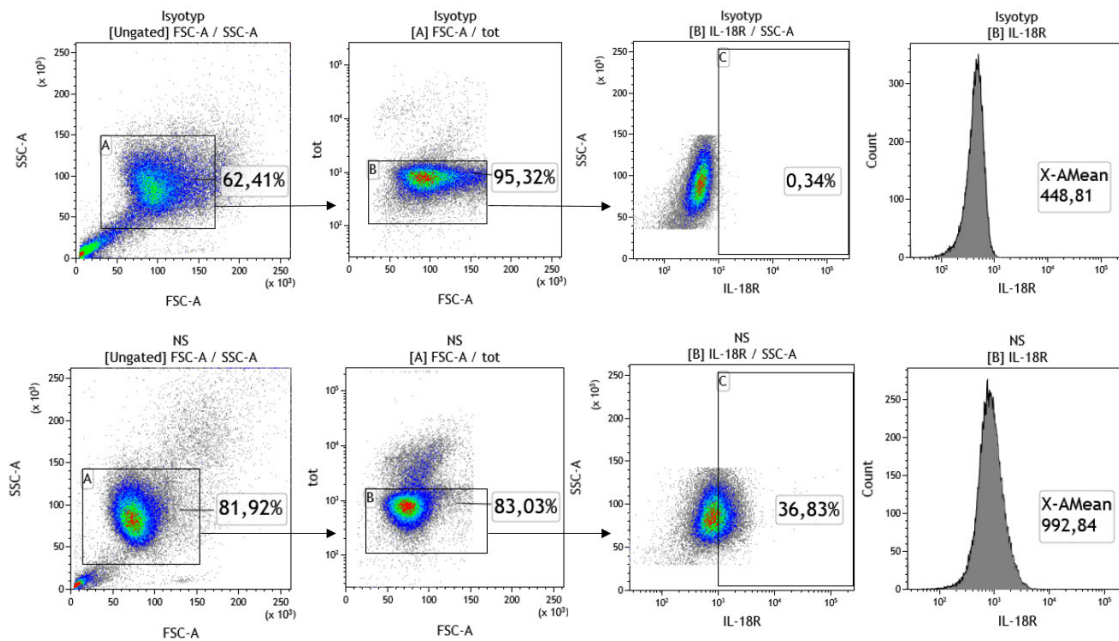


Abbildung 17: Gating Strategie IL-18R α

Eosinophile Granulozyten wurden wie hier beispielhaft an einem AD-Spender dargestellt bei bereits vorliegender Reinheit auf der Basis von *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC) von Zelltrümmern gated (Gate A). Mithilfe des Farbstoffs 7-AAD wurden die toten Zellen markiert und durch Gate B (lebende Zellen) von der Analyse ausgeschlossen. IL-18R-positive Zellen wurden mit Gate C erfasst und über die relative Zellzahl (%) oder die *mean fluorescence intensity* (MFI, entspricht x-AMean) von 50.000 gemessenen Events pro Probe ausgewertet. Gate C wurde anhand der Isotyp-Kontrolle gesetzt.

Nach 20 h Inkubation mit Histamin, dem H₄R-Agonist ST-1006 und dem H₂R-Agonist Amthamin konnte eine übereinstimmende Regulation der IL-18R α Expression wie zur mRNA-Ebene nach 6 h Inkubation gefunden werden. Histamin und Amthamin führten zu einer vergleichbaren, signifikanten Hochregulation der IL-18R α Expression in AD-Patienten, während sich bei Stimulation mit ST-1006 kein signifikanter Unterschied zu NS zeigte. Unter den gesunden Probanden ließ sich zwar eine signifikante Hochregulation der IL-18R α Expression durch Histamin im Vergleich zu NS finden, jedoch konnte der Effekt durch keinen der selektiven Histaminagonisten reproduziert werden (Abb. 19 A und B).

Zur Verifizierung der Rezeptorspezifischen Effekte wurden zusätzlich Versuche mit Histaminrezeptor-Antagonisten durchgeführt. Die Blockade des H₂R mit Ranitidin führte zur Aufhebung des Histamineffekts bei gesunden Probanden und AD-Patienten. Die Blockade des H₄R mit JNJ7777120 wiederum bewirkte in keinem der sechs untersuchten Probanden einen signifikanten Rückgang des Histamineffekts (Abb. 19 C und D). Die Ergebnisse aus der Antagonisierung des H₂R und des H₄R stehen somit im Einklang mit den Effekten durch die Agonisierung.

Die vorangehende Abbildung 18 zeigt die durchflusszytometrischen Ergebnisse eines einzelnen repräsentativen Spenders (Prinzip im Folgenden so fortgeführt).

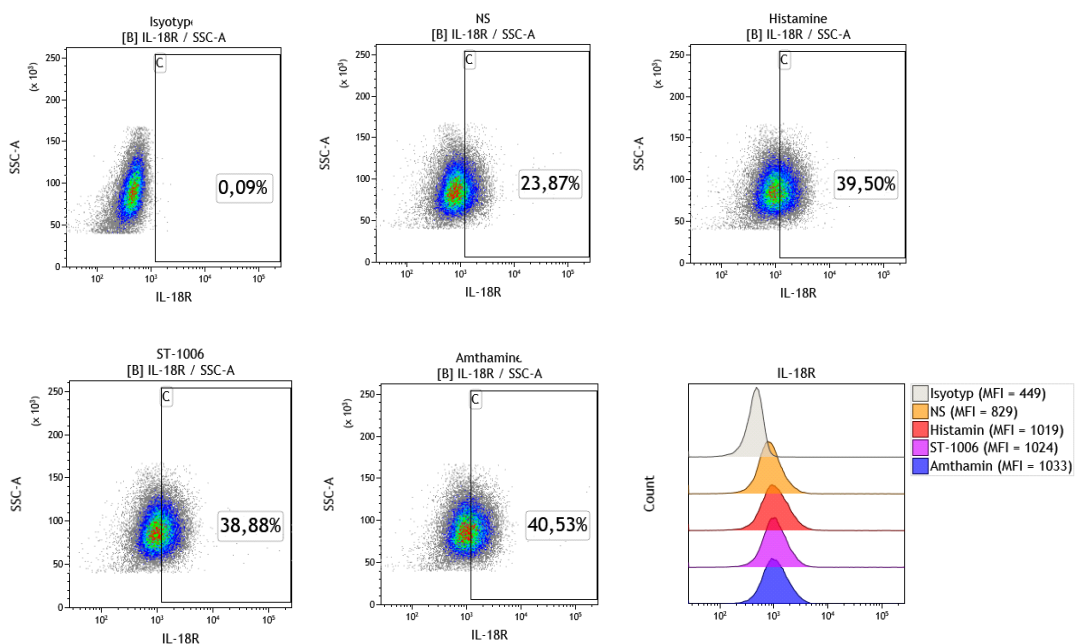


Abbildung 18: Effekt von Histamin, ST-1006 und Amthamin auf IL-18Rα Expression

Eosinophile Granulozyten wurden mit Histamin (10 µmol/l), ST-1006 (10 µmol/l) und Amthamin (10 µmol/l) für 20 h stimuliert. Die IL-18Rα Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Punktdiagramme und Histogramme sind von einem repräsentativen Spender abgebildet. Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper PE Mouse Anti-Human CD218a (IL-18Rα) bzw. mit dem PE Mouse IgG₁ κ für den Isotyp.

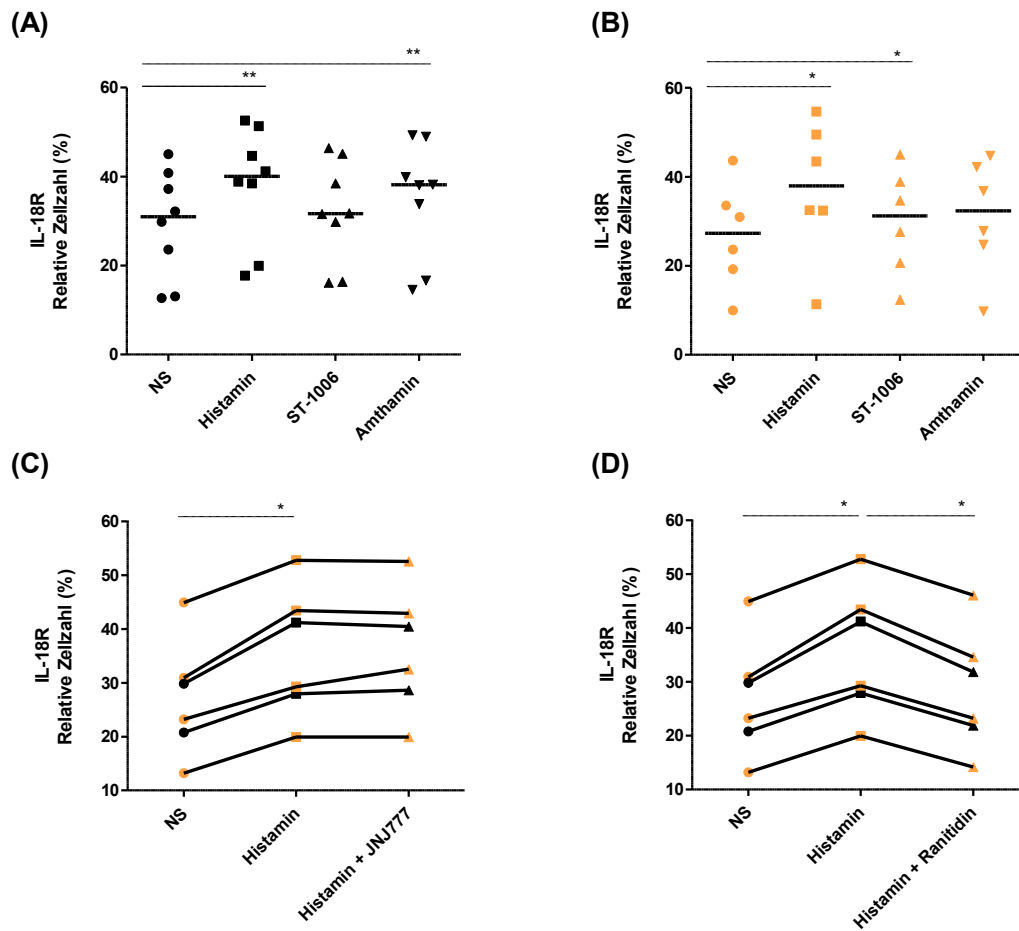


Abbildung 19: Histamin vermittelt Hochregulation der IL-18R α Expression über den H₂R auf Proteinebene

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit Histamin (10 μ mol/l), ST-1006 (10 μ mol/l) und Amthamin (10 μ mol/l) für 20 h stimuliert (A-B). Die selektiven Histaminrezeptor-Antagonisten JNJ777120 (10 μ mol/l) und Ranitidin (10 μ mol/l) wurden eine halbe Stunde vor Histamin zu den Wells gegeben (C-D). Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und im Median (A-B) angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede der gepaarten Stichproben mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet.

Die Validierung der H₄R-vermittelten Hochregulation der IL-18R α mRNA nach 24 h wurde auf Proteinebene nicht weiterverfolgt, da die *in vitro* Viabilität von Eosinophilen ohne entsprechende Überlebensfaktoren (IL-5, GM-CSF, IL-3) im Zeitverlauf stark abfällt (Tai et al., 1991) und Langzeituntersuchungen erschwert.

3.2.3 Die IL-18R α Induktion durch Histamin korreliert mit Anteil an Eosinophilen im Blut

Der Einfluss von Histamin auf die Regulation der IL-18R α Expression wurde in den vorangegangenen Kapiteln auf mRNA Ebene sowie auf Proteinebene analysiert.

Das Ausmaß der Histamin-vermittelten Induktion korrelierte dabei positiv mit der Prozentzahl an Eosinophilen im Blut von den untersuchten Probanden. Während sich auf mRNA-Ebene nur ein schwach ausgeprägter Trend abzeichnete (Daten nicht gezeigt), ließ sich auf Proteinebene eine signifikante, positive Korrelation zwischen der x-fachen Induktion des IL-18R α und dem Anteil an Eosinophilen feststellen ($p = 0,034$; $r = 0,452$) (Abb. 20). Im Vergleich zu den Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurde hier eine größere Anzahl an Probanden eingeschleust.

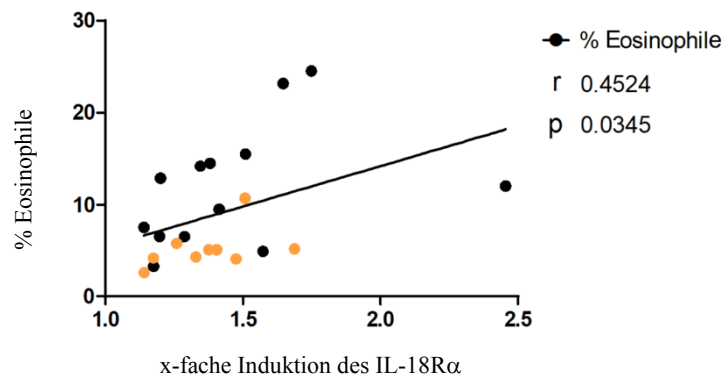


Abbildung 20: Die IL-18R α Induktion durch Histamin korreliert signifikant mit Anteil an Eosinophilen im Blut

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Histamin für 20 h (siehe Abb. 19 A) stimuliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre IL-18R α Expression im Vergleich zu NS hin analysiert. Der Quotient aus Histamin/NS wurde als die x-fache Induktion des IL-18R α mit dem mikroskopisch bestimmten Anteil an Eosinophilen im Blut korreliert. Für die statistische Analyse wurde die Rangkorrelation nach Spearman berechnet.

3.2.4 Histamin potenziert die IFN- γ -vermittelte Hochregulation der IL-18R α Expression über den H $_2$ R

Nachdem die IL-18R α Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene nachweislich durch Histamin über den H $_2$ R gesteigert werden konnte, wurde im weiteren Verlauf der Einfluss von AD-assoziierten Zytokinen im Zusammenspiel mit Histamin untersucht.

Eine IFN- γ -vermittelte Hochregulation der IL-18R α Protein-Expression konnte auf humanen dendritischen Zellen bereits gezeigt werden (Gutzmer et al., 2003). Somit galt IFN- γ in diesem Versuch als Positivkontrolle. Auf die IL-18R α Expression von Eosinophilen von AD-Patienten zeigte IFN- γ im Durchschnitt einen vergleichbaren Effekt zu Histamin. Durch die Kombination von IFN- γ mit Histamin konnte ein additiver Effekt der beiden Stimulanzen beobachtet werden. Bei gesunden Probanden ergab sich in der IL-18R α Expression kein signifikanter Unterschied zwischen IFN- γ und NS. Die Kombination aus IFN- γ und Histamin erzeugte jedoch auch hier eine signifikante Effektsteigerung im Vergleich zu Histamin allein (Abb. 22 A und B). Über die selektive Blockade des H₂R mit Ranitidin ließ sich in IFN- γ - und Histamin-inkubierten Eosinophilen ein signifikanter Rückgang des additiven Effekts auf das Ausgangsniveau von IFN- γ feststellen. Mit der H₄R-Blockade über JNJ777120 wiederum blieb der gemeinsame Effekt von IFN- γ und Histamin bei AD-Patienten und gesunden Probanden unverändert. Konsistent dazu zeigte auch der H₄R-Agonist ST-1006 keinen Einfluss (Abb. 22 C-E).

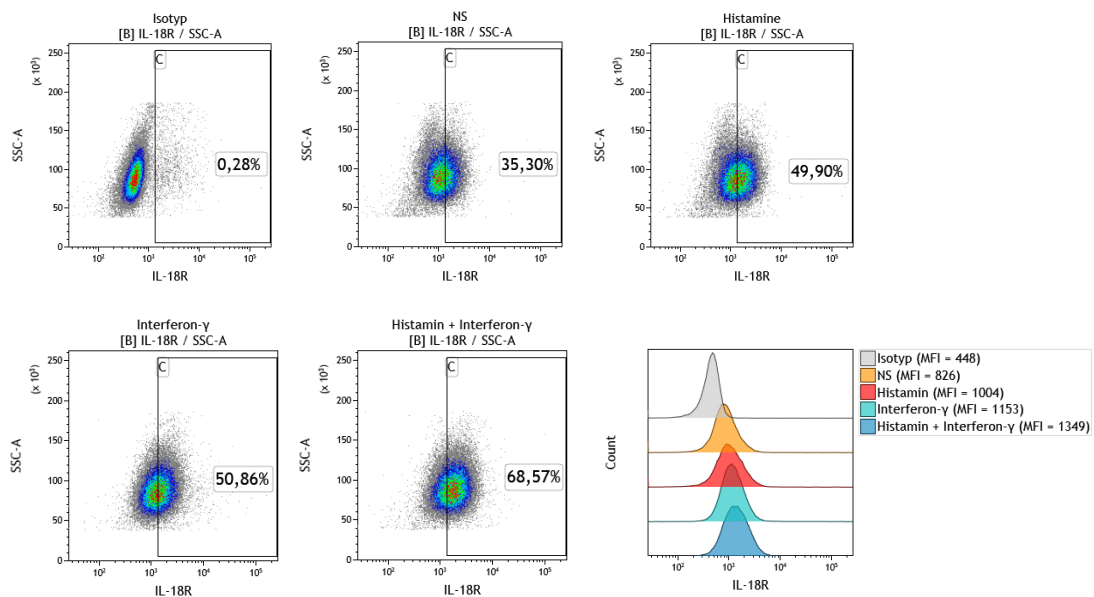


Abbildung 21: Effekt von IFN- γ und Histamin + IFN- γ auf IL-18R α Expression

Eosinophile Granulozyten wurden mit Histamin (10 μ mol/l), IFN- γ (10 ng/ml) und der Kombination aus beiden Stimulanzen für 20 h stimuliert. Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Punktdiagramme und Histogramme sind von einem repräsentativen Spender abgebildet. Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper PE Mouse Anti-Human CD218a (IL-18R α) bzw. mit dem PE Mouse IgG κ für den Isotyp.

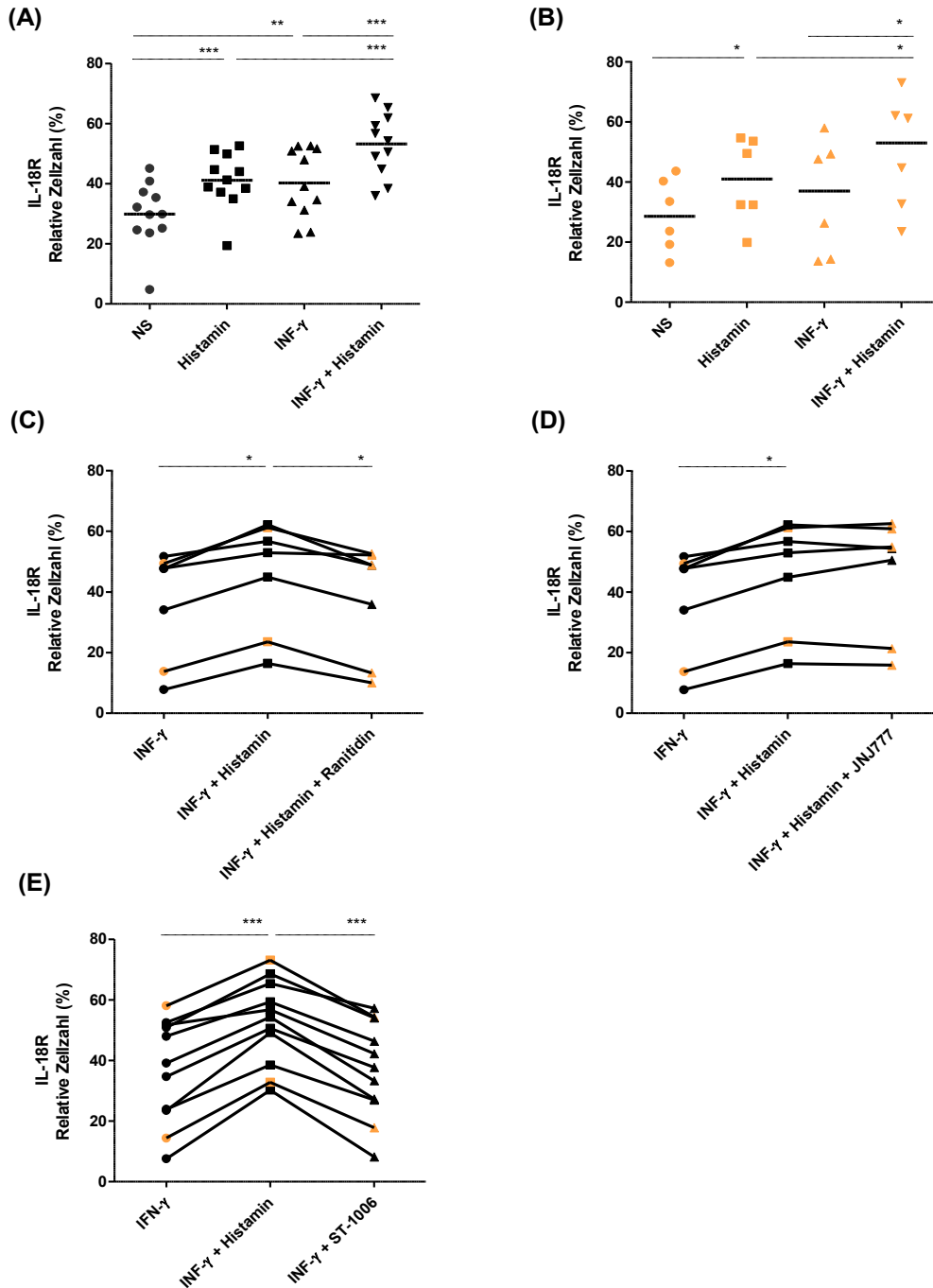


Abbildung 22: Histamin potenziert die IFN- γ -vermittelte Hochregulation der IL-18R α Expression über den H₂R

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit Histamin (10 μ mol/l), IFN- γ (10 ng/ml) und der Kombination aus Histamin (10 μ mol/l) oder ST-1006 (10 μ mol/l) mit IFN- γ (10 ng/ml) für 20 h stimuliert (A-E). Die selektiven Histaminrezeptor-Antagonisten Ranitidin (10 μ mol/l) und JNJ777 (10 μ mol/l) wurden eine halbe Stunde vor IFN- γ und Histamin appliziert (C-D). Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im **Mittelwert (A)** und **Median (B)** angezeigt. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede in B-D mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet, in A und E mit einem gepaarten t-Test.

3.2.5 Histamin hebt die IL-5-vermittelte Herunterregulation der IL-18R α Expression über den H₄R auf

Neben dem Th₁-Zytokin IFN- γ untersuchten wir ebenfalls den Einfluss Th₂-dominierender Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) auf die IL-18R α Protein-Expression. Eosinophile von AD-Patienten wiesen nach Stimulation mit IL-5 eine signifikante Herunterregulation der IL-18R α Expression auf. Auch bei Gesunden war ein entsprechender Trend zu beobachten, jedoch mit deutlich geringerem Effekt. IL-4 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die IL-18R α Expression in AD-Patienten. Bei Gesunden hingegen ließ sich ein milder, hochregulatorischer Effekt durch IL-4 feststellen. Nach Stimulation mit IL-13 blieb die IL-18R α Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten und Gesunden unbeeinflusst (Abb. 24 A und B). In Kombination mit Histamin ließ sich die IL-5-induzierte Herunterregulation signifikant umkehren und über das NS-Niveau hinaus anheben. Dieser Effekt war vor allem in AD-Patienten, aber auch in gesunden Probanden erkennbar. Der H₄R-Agonist ST-1006 zeigte kombiniert mit IL-5 einen im Durchschnitt vergleichbaren Effekt zu Histamin und IL-5. Auch hier ließ sich der Effekt vorrangig in AD-Patienten umkehren (Abb. 24 C und D). Die beiden Zytokine IL-4 und IL-13 hatten auch in Kombination mit Histamin keinen Einfluss auf die IL-18R α Expression, was im Einklang mit den Ergebnissen der vorangegangenen Einzeluntersuchungen von IL-4 und IL-13 steht. Ihre Kombination mit ST-1006 führte ebenso zu keinem Unterschied in der IL-18R α Expression (Abb. 24 E und F).

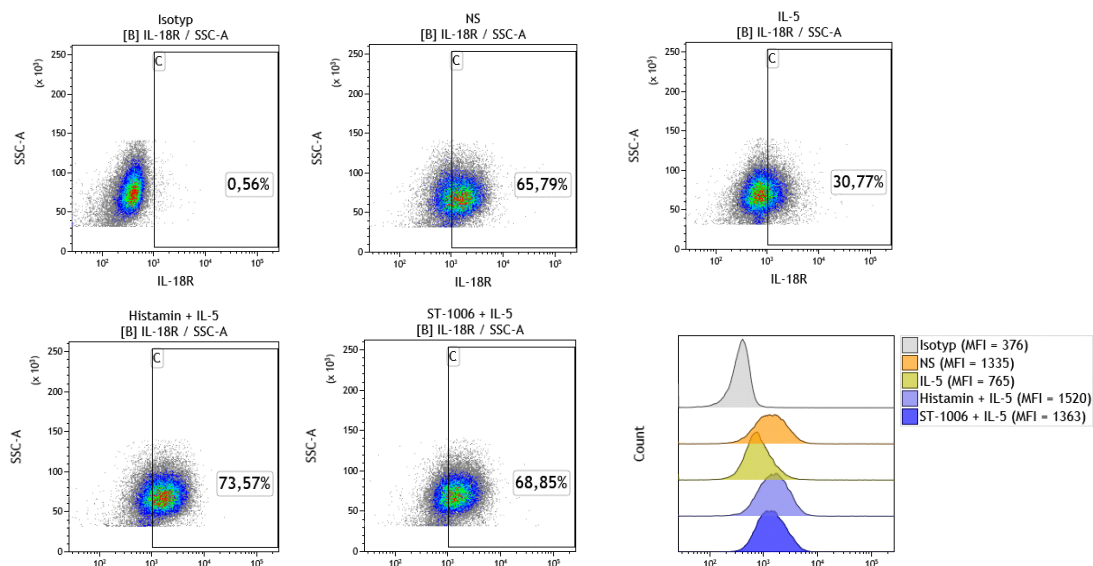


Abbildung 23: Effekt von IL-5 und Histamin + IL-5 auf die IL-18R α Expression

Eosinophile Granulozyten wurden mit IL-5 (10 ng/ml) und der Kombination aus IL-5 mit Histamin (10 μ mol/l) oder ST-1006 (10 μ mol/l) für 20 h stimuliert. Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Punktdiagramme und Histogramme sind von einem repräsentativen Spender abgebildet. Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper PE Mouse Anti-Human CD218a bzw. mit dem PE Mouse IgG₁ κ für den Isotyp.

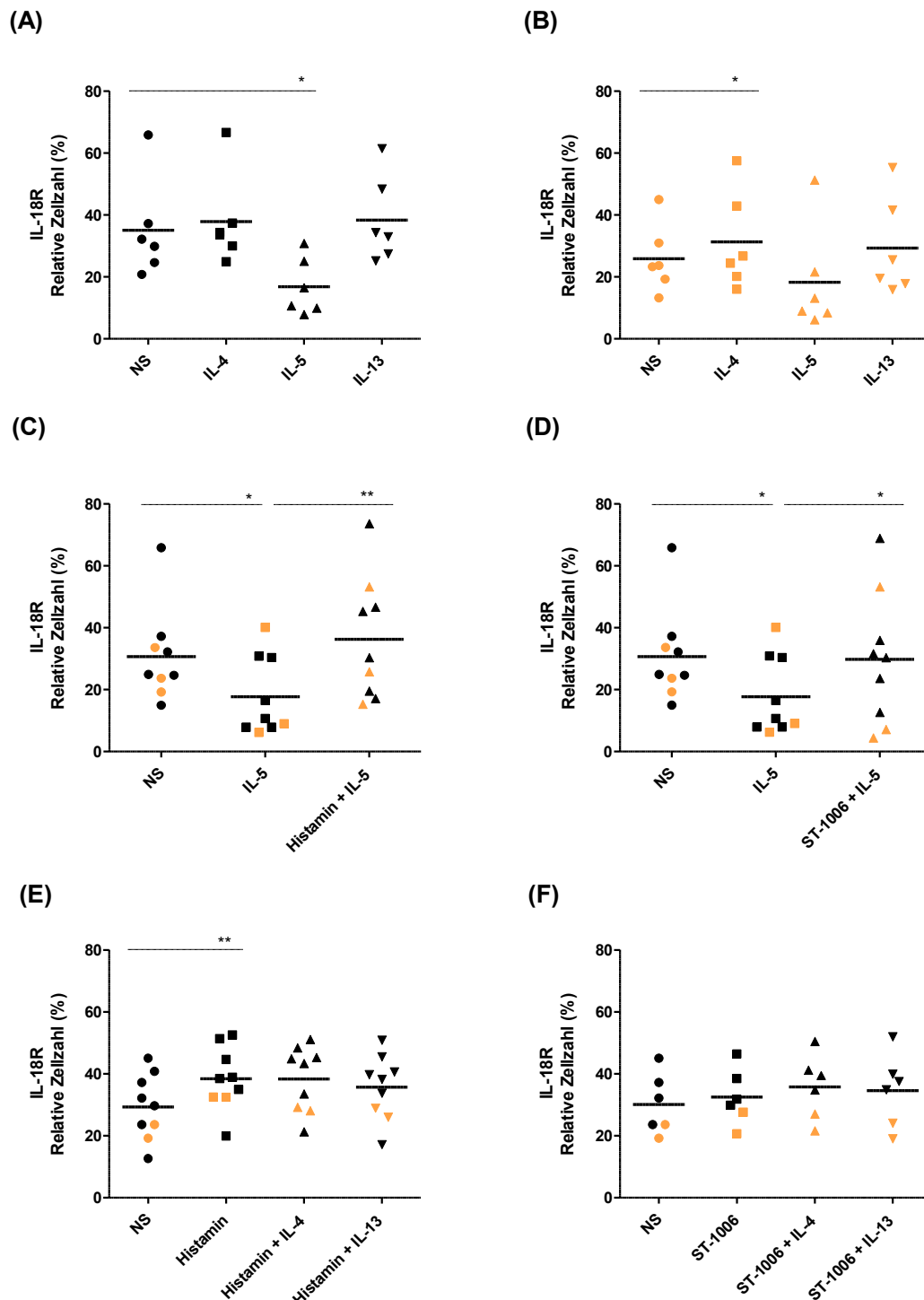


Abbildung 24: Histamin hebt die IL-5-vermittelte Herunterregulation der IL-18R α Expression über den H₄R auf

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit IL-4 (10 ng/ml), IL-5 (10 ng/ml) und IL-13 (10 ng/ml) sowie mit einer Kombination der Zytokine mit Histamin (10 μ mol/l) oder ST-1006 (10 μ mol/l) für 20 h stimuliert. Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im Median dargestellt. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet.

3.2.6 Kein Einfluss von IL-18 auf die IL-18R α Expression

Da bisher der Einfluss von IL-18 auf die Expression seines eigenen Rezeptors auf Eosinophilen unerforscht ist, führten wir zusätzliche Experimente mit Eosinophilen nach IL-18-Stimulation durch. Weder bei AD-Patienten noch bei gesunden Probanden zeigte sich allerdings durchflusszytometrisch eine signifikante Veränderung in der IL-18R α Expression durch IL-18 Stimulation im Vergleich zu NS (siehe Anhang 1).

3.2.7 Untersuchungen zur funktionellen Expression des IL-18R Proteins auf humanen Eosinophilen

3.2.7.1 IL-18 steigert die ECP und EDN mRNA Expression über IL-18R α

Im Anschluss an die Untersuchungen zum regulativen Einfluss von Histamin sowie von Th₁- und Th₂-assoziierten Zytokinen auf die IL-18R α Expression auf Eosinophilen erfolgte die Überprüfung der Rezeptor*funktionalität*.

Das Grundkonzept hierfür lag darin, die Expression des IL-18R α auf der Zelloberfläche von Eosinophilen zunächst durch eine Präinkubation mit Histamin + IFN- γ möglichst stark anzuheben und im nächsten Schritt die Granulaproteinausschüttung durch die Rezeptorstimulation mit IL-18 zu messen. Untersuchungen von Verma et al. konnten im Mausmodell bereits einen Hinweis darauf liefern, dass die Stimulation des IL-18R auf Eosinophilen zu einer gesteigerten mRNA Expression der Granulaproteine MBP, EPO, ECP und EDN führt (Verma et al., 2019).

Die Kombination aus Histamin + IFN- γ hatte sich in den vorangegangenen Experimenten als stärkster Induktor der IL-18R α Expression erwiesen. Eosinophile wurden so in einem Doppelansatz mit Histamin + IFN- γ stimuliert bzw. nicht-stimuliert belassen und dann für 18 h inkubiert. Hinterher wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem RPMI complete aufgenommen. Einer der beiden Ansätze wurde im Folgenden mit IL-18 stimuliert, während der zweite nicht-stimuliert blieb und als Kontrollansatz diente. Nach weiteren 6 h Inkubation folgte die Vorbereitung der Proben zur Analyse der IL-18R-gesteuerten Induktion von ECP und EDN auf mRNA-Ebene (mittels RT-PCR) und Proteinebene (mittels ELISA).

Im Vergleich der beiden Ansätze („Kontrolle“ und „+ IL-18“) ließ sich eine gesteigerte EDN und ECP mRNA Expression durch die IL-18 Stimulation in den mit Histamin + IFN- γ präinkubierten Eosinophilen von AD-Patienten erkennen. Dabei vermittelte IL-18 über den IL-18R α einen größeren Effekt auf die ECP mRNA Expression als auf die EDN mRNA Expression. Auch die basale Expression der ECP mRNA war höher im Vergleich zur EDN mRNA Expression (Abb. 25 A und C). Bei den gesunden Probanden konnte kein eindeutiger Trend im Vergleich der Histamin- + IFN- γ -stimulierten Proben aus den zwei Ansätzen gefunden werden (Abb. 25 B und D).

Der Unterschied von Histamin + IFN- γ zu NS war auch unabhängig von der IL-18-Stimulation signifikant, da IFN- γ selbst ebenfalls die ECP- und EDN-Ausschüttung (Degranulation) verstärkt (Yamaguchi et al., 2008).

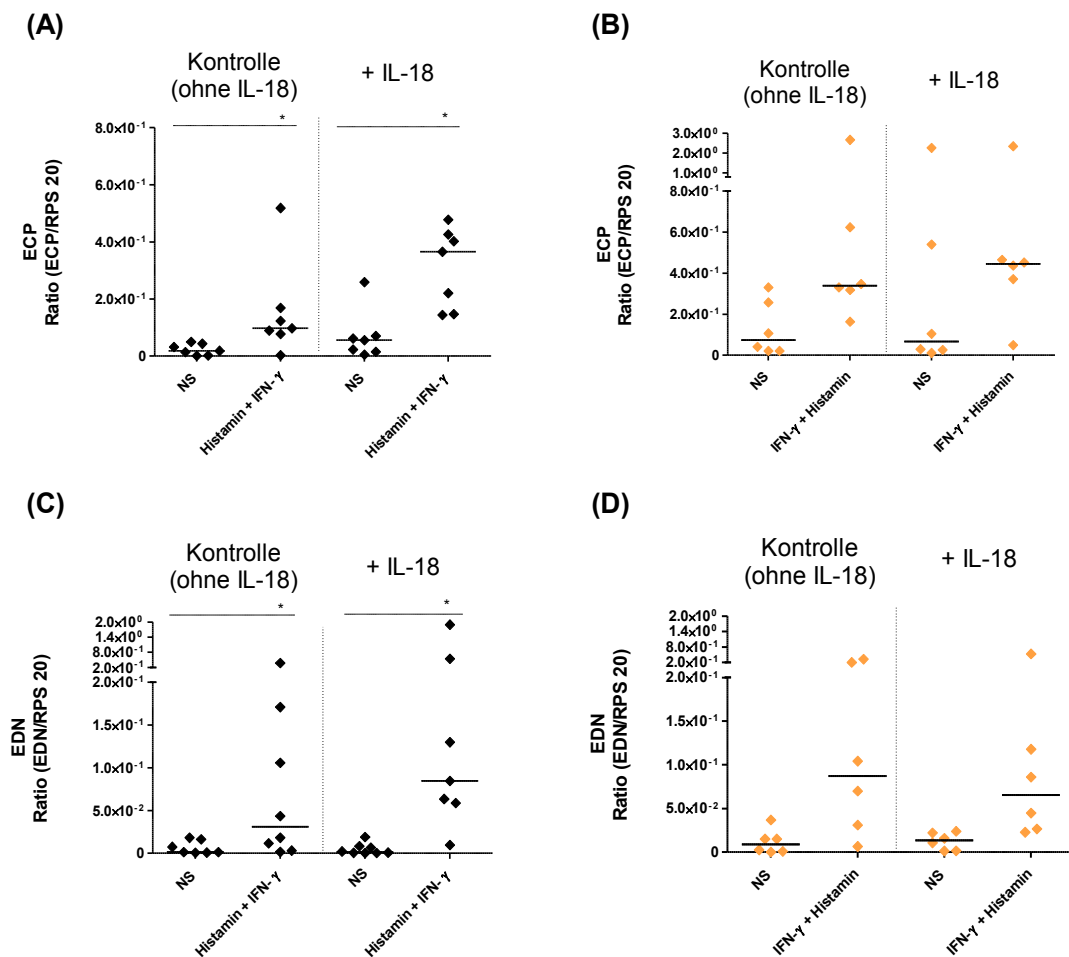


Abbildung 25: IL-18 steigert die ECP und EDN mRNA Expression über IL-18R α

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz, n = 7) und gesunden Probanden (orange, n = 6) wurden mit Histamin (10 μ mol/l) + IFN- γ (10 ng/ml) im Doppelansatz für 18 h präinkubiert bzw. nicht-stimuliert (NS) belassen. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und in neues Nährmedium (RPMI Complete) überführt. Hier wurde ein Ansatz mit IL-18 (10 ng/ml) für weitere 6 h inkubiert, während der Kontrollansatz nicht-stimuliert blieb. Die gemessene ECP und EDN mRNA Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt und ist im Median dargestellt. Die statistischen Unterschiede der gepaarten Stichproben wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test errechnet.

3.2.7.2 IL-18R α -abhängige Steigerung der ECP Protein Expression im ELISA technisch nicht validierbar

Für die weiterführende Überprüfung der IL-18R α -abhängigen Steigerung der ECP Expression auf Proteinebene wurde ein ELISA mit dem Human Ribonuclease 3 SimpleStep Kit durchgeführt. Hierzu wurden die Überstände der kultivierten Eosinophilen, wie in 3.2.7.1 beschrieben, verwendet. Die Höhe der ECP Proteinkonzentration in den Proben konnte allerdings aufgrund einer durchgängigen Überschreitung des höchsten Standards von 600 pg/ml nicht bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Wiederholung der Messung mit einem anderen ELISA Kit war aus zeitlichen Gründen (Lieferengpässe zur SARS-CoV-2-Pandemie) im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich.

3.2.7.3 Kein Einfluss von IL-18 auf die CD274 (PD-L1) Expression

CD101⁺ CD274⁺ doppelt positive Eosinophile gelten als Subtypen einer „pathogenen“ Untergruppe an Eosinophilen und können durch IL-18 Stimulation induziert werden. Bisher wurden diese IL-18-transformierten Eosinophilen im peripheren Gewebe von Patienten mit allergischem Asthma und eosinophiler Ösophagitis nachgewiesen (Venkateshaiah et al., 2018). In unseren Untersuchungen mit Eosinophilen von AD-Patienten konnte die CD274 (auch PD-L1 genannt) mRNA nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an IL-18 nicht regelmäßig nachgewiesen werden. Unter mehreren Stimulanzien zur Präinkubation ließ sie sich ausschließlich in mit Histamin + IFN- γ präinkubierten Eosinophilen detektieren. Hier konnte jedoch keine dosisabhängige Induktion der CD274 (PD-L1) mRNA Expression festgestellt werden (siehe Anhang 2). Weiterhin war auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie keine CD274 (PD-L1) Expression auf IL-18-stimulierten Eosinophilen messbar.

3.3 Untersuchungen zu CD69

Die Untersuchungen des Aktivierungsmarkers CD69 erfolgte auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie. In Abbildung 26 ist die Gating Strategie für die CD69 Expression exemplarisch dargestellt.

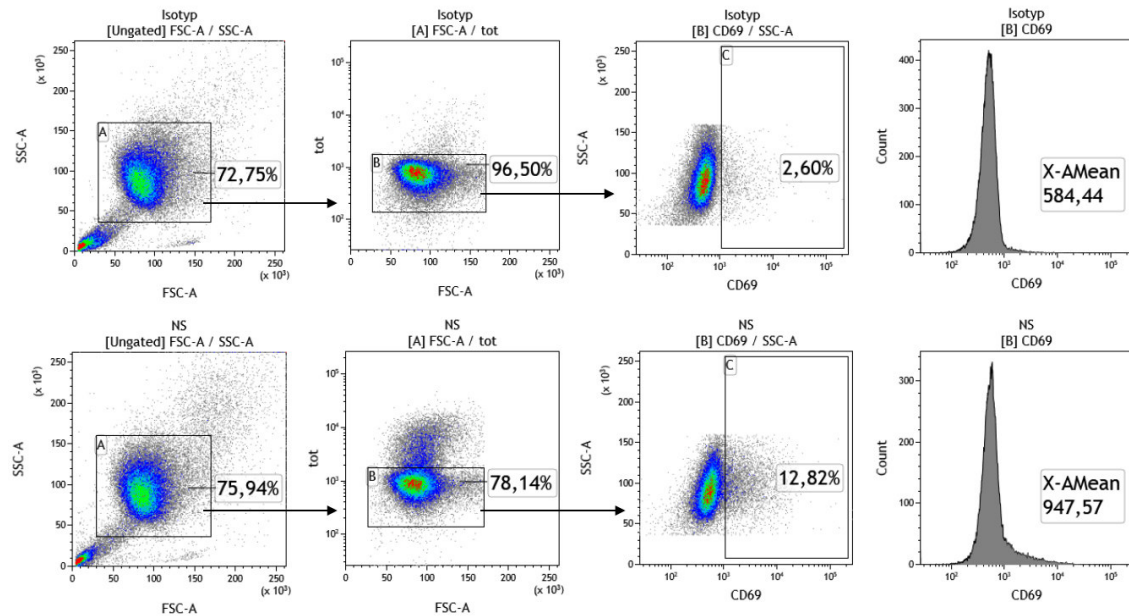


Abbildung 26: Gating Strategie CD69

Eosinophile Granulozyten wurden wie hier beispielhaft an einem AD-Spender dargestellt bei bereits vorliegender Reinheit auf der Basis von *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC) von Zelltrümmern gated (Gate A). Mithilfe des Farbstoffs 7-AAD wurden die toten Zellen markiert und durch Gate B (lebende Zellen) von der Analyse ausgeschlossen. CD69-positive Zellen wurden mit Gate C erfasst und über die relative Zellzahl (%) oder die *mean fluorescence intensity* (MFI, entspricht X-A-Mean) von 50.000 gemessenen Events pro Probe ausgewertet. Gate C wurde anhand der Isotyp-Kontrolle gesetzt.

3.3.1 Histamin verstärkt die IL-5-vermittelte Hochregulation der CD69 Protein Expression über den H₄R in AD-Patienten

Unter dem Einfluss von Histamin wiesen Eosinophile von AD-Patienten in den vorliegenden Experimenten eine milde, aber hochsignifikante Herunterregulation der CD69 Protein Expression im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollen auf. Bei gesunden Probanden führte Histamin zu keiner einheitlichen Herunterregulation (Abb. 28 A und B). Im Einklang mit vorangegangenen Studien (Nishikawa et al., 1992; Urasaki et al., 2001) führte IL-5 allein sowohl auf Eosinophilen von Gesunden, als auch von AD-Patienten zu einer signifikanten Hochregulation der CD69 Protein Expression. Die weitere Kombination von IL-5 mit Histamin jedoch ergab eine deutliche Potenzierung des IL-5-vermittelten, hochregulatorischen Effekts auf Eosinophilen von AD-

Patienten. Auch bei Gesunden war dieser Trend in 7 von 9 untersuchten Probanden erkennbar (Abb. 28 C und D). Die Kombination von IL-5 mit dem H₄R-Agonisten ST-1006 zeigte ebenso wie die Kombination von IL-5 und Histamin eine signifikante Effektsteigerung in AD-Patienten im Vergleich zu IL-5. IL-5 kombiniert mit Amthamin hingegen konnte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu IL-5 in AD-Patienten hervorrufen. Bei Gesunden fand sich ein vergleichbarer Trend von IL-5 und Amthamin zu IL-5 und ST-1006 (Abb. 28 E und F).

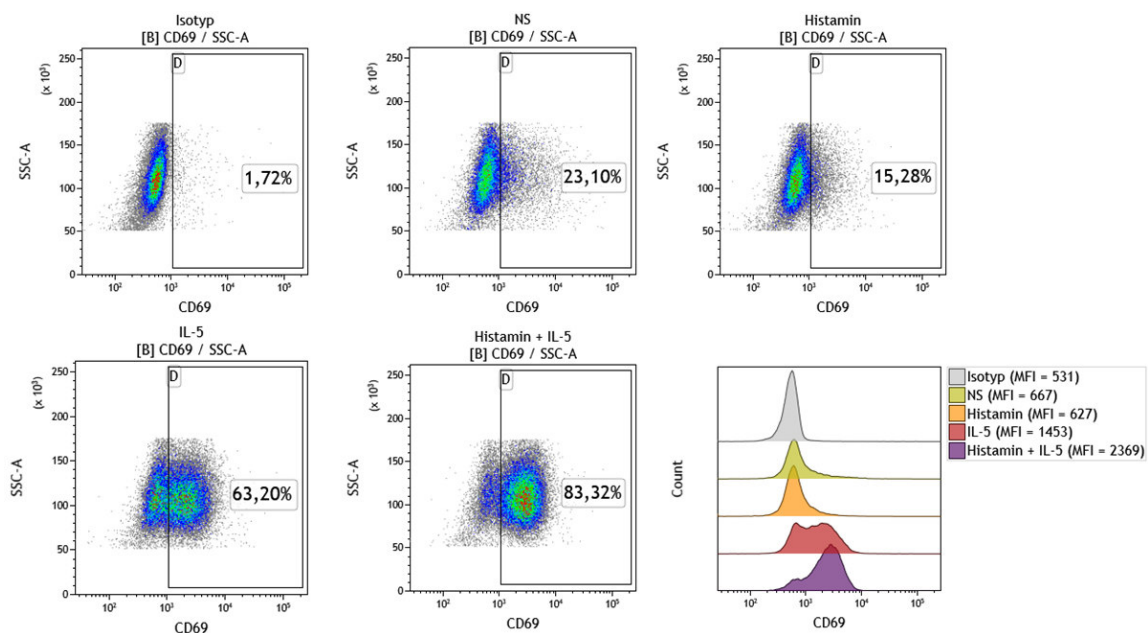


Abbildung 27: Effekt von IL-5 und Histamin + IL-5 auf die CD69 Protein Expression

Eosinophile Granulozyten wurden mit Histamin (10 μ mol/l), IL-5 (10 ng/ml) und der Kombination aus IL-5 und Histamin für 20 h stimuliert. Die CD69 Protein Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Punktdiagramme und Histogramme sind von einem repräsentativen Spender abgebildet und geben den prozentualen Anteil CD69-positiver Zellen bzw. die *mean fluorescence intensity* (MFI) wieder. Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper FITC Mouse Anti-Human CD69 bzw. mit dem FITC Mouse IgG₁ κ für den Isotyp.

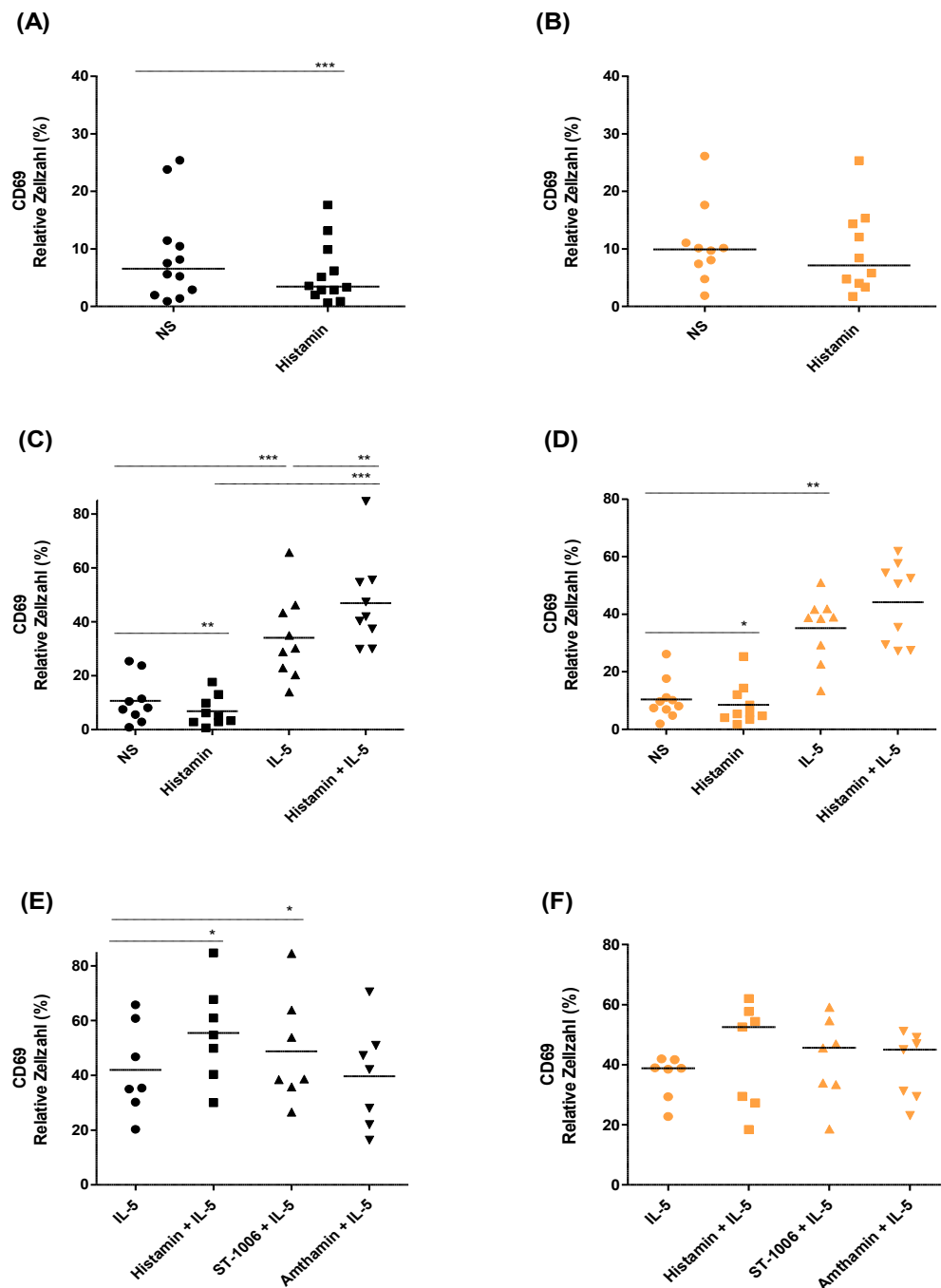


Abbildung 28: Histamin verstärkt die IL-5-vermittelte Hochregulation der CD69 Protein Expression über den H₄R in AD-Patienten

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit Histamin (10 $\mu\text{mol/l}$) und IL-5 (10 ng/ml) sowie der Kombination aus IL-5 mit Histamin (10 $\mu\text{mol/l}$), ST-1006 (10 $\mu\text{mol/l}$) oder Amthamin (10 $\mu\text{mol/l}$) für 20 h stimuliert. Die CD69 Protein Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im **Median (A-B, D-F)** und **Mittelwert (C)** angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede in A-B sowie D-F mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. Für C wurde ein gepaarter t-Test verwendet.

3.3.2 Histamin verstärkt die IFN- γ -vermittelte Hochregulation der CD69 Protein Expression in AD-Patienten

Ähnlich zu IL-5 führte auch IFN- γ zu einer deutlichen Hochregulation der CD69 Protein Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten und gesunden Probanden, wie auch bereits beschrieben ist (Ochiai et al., 2001). Durch die Kombination von IFN- γ mit Histamin ließ sich erneut eine signifikante Effektsteigerung in AD-Patienten finden. Bei gesunden Probanden konnte dagegen kein additiver Effekt von Histamin auf IFN- γ beobachtet werden (Abb. 30 A und B). Über eine Dreifachkombination von IFN- γ , Histamin und IL-18 konnte in 5 von 7 untersuchten Probanden nochmals eine Effektsteigerung im Vergleich zu IFN- γ und Histamin allein gemessen werden, die allerdings nur im Trend zu erkennen ist. Die Stimulation mit IL-18 allein ergab keinen signifikanten Unterschied in der CD69 Protein Expression im Vergleich zu NS (Abb. 30 C und D). Histamin und IL-18, genauso wie der H₄R-Agonist ST-1006 und IL-18, führten zu keiner veränderten CD69 Protein Expression verglichen zu NS. Die Kombination aus Anthamin und IL-18 zeigte eine signifikante Herunterregulation der CD69 Expression im Vergleich zu IL-18. Dieser Effekt ist auf die Herunterregulation der CD69 Protein Expression durch Histamin zurückzuführen (Abb. 30 E und F).

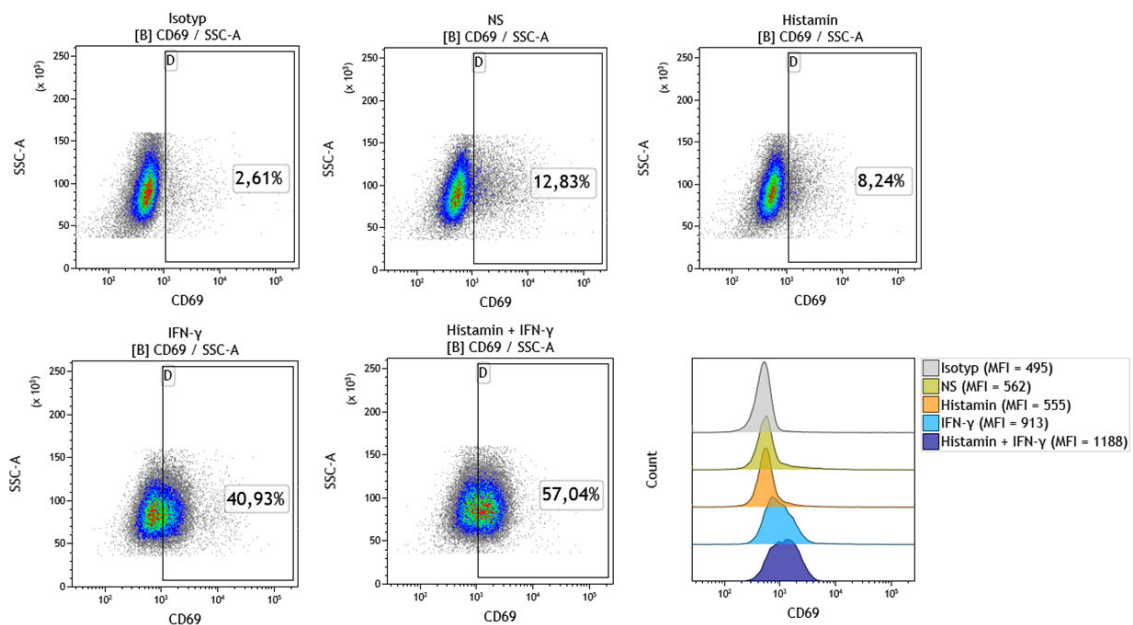


Abbildung 29: Effekt von IFN- γ und Histamin + IFN- γ auf die CD69 Protein Expression

Eosinophile Granulozyten wurden mit Histamin (10 μ mol/l), IFN- γ (10 ng/ml) und der Kombination aus IFN- γ und Histamin für 20 h stimuliert. Die CD69 Protein Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Punktdiagramme und Histogramme sind von einem repräsentativen Spender abgebildet und geben den prozentualen Anteil CD69-positiver Zellen bzw. die *mean fluorescence intensity* (MFI) wieder. Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper FITC Mouse Anti-Human CD69 bzw. mit dem FITC Mouse IgG₁ κ für den Isotyp.

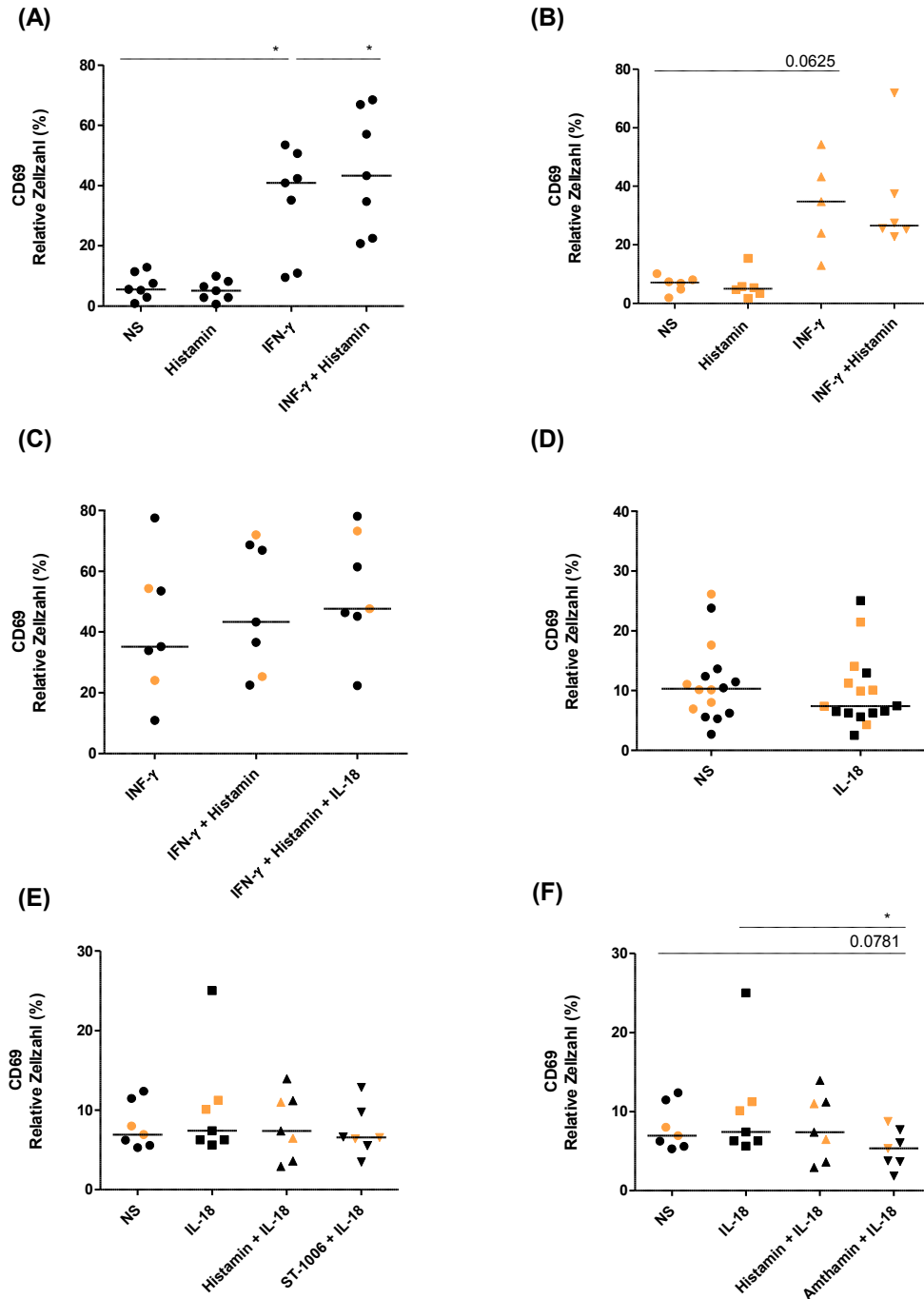


Abbildung 30: Histamin verstärkt die IFN- γ -vermittelte Hochregulation von CD69 Protein Expression in AD-Patienten

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit Histamin (10 μ mol/l), IFN- γ (10 ng/ml) und der Kombination aus Histamin + IFN- γ sowie Histamin + IFN- γ + IL-18 (10 ng/ml) für 20 h stimuliert (A-C). Weiterhin wurden eosinophile Granulozyten mit IL-18 (10 ng/ml) und der Kombination aus IL-18 mit Histamin (10 μ mol/l), ST-1006 (10 μ mol/l) oder Amthamin (10 μ mol/l) für 20 h inkubiert (D-F). Die CD69 Protein Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im Median angegeben. Für die statistischen Analysen wurden die Unterschiede mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test errechnet.

3.3.3 Leichte Steigerung der CD69 Protein Expression durch Kombination von Histamin mit IL-4 oder IL-13

Bei Stimulation mit den Th₂-Zytokinen IL-4 und IL-13 konnte kein signifikanter Unterschied in der CD69 Protein Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten und gesunden Probanden im Vergleich zu NS gefunden werden. Wie zuvor bei IL-5 konnte jedoch die Kombination von IL-4 + Histamin und IL-13 + Histamin auch hier eine signifikant höhere CD69 Protein Expression induzieren (Abb. 31 A und B).

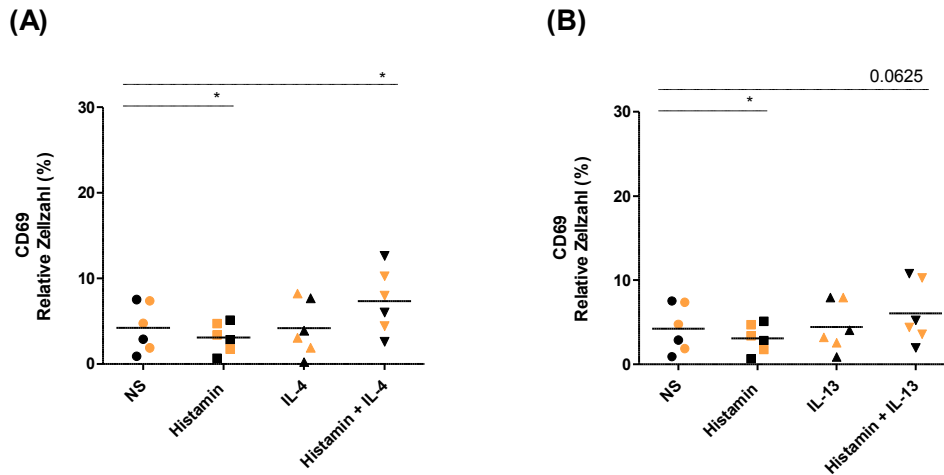


Abbildung 31: Leichte Steigerung der CD69 Protein Expression durch Kombination von Histamin mit IL-4 oder IL-13

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden mit Histamin (10 μ mol/l), IL-4 (10 ng/ml) und IL-13 (10 ng/ml) für 20 h stimuliert. Die Eosinophilen wurden außerdem mit einer Kombination aus Histamin und IL-4 oder IL-13 für 20 h inkubiert (A und B). Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im Median dargestellt. Für die statistische Analyse wurden die Unterschiede mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test errechnet.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Histamin und insbesondere dem H₄R auf die Regulation und Expression von IL-18 und dem IL-18R α auf humanen eosinophilen Granulozyten zu untersuchen. In diesem Rahmen wurde zusätzlich die Bedeutung des H₂R sowie von Th₁- und Th₂-assoziierten Zytokinen für die Regulation von IL-18 und dem IL-18R α ermittelt. Simultan erfolgte die Analyse der CD69 Expression zur Überprüfung einer stimulationsbedingten Aktivierung der isolierten Eosinophilen.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die IL-18 mRNA sowie die IL-18R α mRNA und Protein Expression in Eosinophilen von AD-Patienten durch Histamin signifikant gesteigert wird und dass dieser Effekt über den H₂R vermittelt wird. Das Ausmaß der Histamin-induzierten Hochregulation des IL-18R α korrelierte signifikant mit dem Anteil an Eosinophilen im Blut von AD-Patienten. Im Gegensatz dazu war die Basisexpression von IL-18 und dem IL-18R α auf Eosinophilen von AD-Patienten auf mRNA Ebene signifikant erniedrigt im Vergleich zur nicht-atopischen Kontrollgruppe.

Weiterhin konnten wir feststellen, dass Histamin über den H₂R signifikant die hochregulatorische Wirkung von IFN- γ auf die IL-18R α Expression verstärkt und über den H₄R den herunterregulatorischen Effekt von IL-5 aufhebt. IL-18 selbst zeigte keinen Effekt auf die Regulation vom IL-18R α . Eine Steigerung der EDN und ECP mRNA Expression durch IL-18 Stimulation bei Histamin + IFN- γ -präinkubierten Zellen verdeutlichte die Funktionalität des IL-18R auf Eosinophilen von AD-Patienten sowie ihre erhöhte Aktivität durch Histamin.

Um zu ermitteln, ob Histamin zu einer generellen Aktivierungssteigerung bei Eosinophilen führt, wurde der Marker CD69 untersucht. Hier konnten wir eine leichte, aber signifikante Herunterregulation der CD69 Protein Expression durch Histamin auf Eosinophilen von AD-Patienten feststellen. Im Gegensatz dazu führte Histamin zu einer Potenzierung der IFN- γ - und, über den H₄R, der IL-5-vermittelten Steigerung der CD69 Protein Expression. IL-18 zeigte keinen regulativen Einfluss.

4.2 Diskussion der Methodik

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte im Hinblick auf die AD-Patienten zum überwiegenden Anteil in der dermatologischen Tagesklinik oder Ambulanz der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Hier führten Ärzte die Aufklärung über die Teilnahme an der wissenschaftlichen Studie sowie die Bestimmung des Schweregrades der AD (SCORAD) durch. Gesunde Kontrollprobanden wurden aus dem eigenen sozialen Umfeld rekrutiert und nicht individuell mit den AD-Patienten gematcht. Die begrenzte Probandenzahl und das fehlende

Matching ist eine Einschränkung für die Aussagefähigkeit. Grundlagenforschung wie diese Studie bietet jedoch erste, wichtige Hinweise für potenzielle Zusammenhänge, die in größer angelegten Nachfolgeuntersuchungen erweitert werden können.

Zwischen AD-Patienten und gesunden Probanden findet sich eine ähnliche Altersverteilung in der vorliegenden Studie: AD-Patienten waren im Durchschnitt 33,4 Jahre, die gesunden Probanden im Durchschnitt 29,3 Jahre. Dies war von Vorteil für den direkten Vergleich der beiden Gruppen auf immunologischer Ebene, da sich mit zunehmendem Alter sowohl die Häufigkeit der Immunzellen als auch ihre Funktionalität verändert, womit eine Abschwächung der Immunantwort einhergeht (Alpert et al., 2019). Auch weitere verzerrende Effekte von einer ungleichen Altersverteilung konnten dadurch ausgeräumt werden, wie zum Beispiel das häufigere Auftreten von (Begleit-)Erkrankungen oder die vermehrte Einnahme von Medikamenten im fortgeschrittenen Lebensalter.

Für jeden Probanden dieser Studie wurde mikroskopisch der prozentuale Anteil an Eosinophilen im Blut bestimmt. Eine Erhöhung dieses Anteils ($> 4\%$) bei Gesunden wurde hinsichtlich sonstiger Erkrankungen mit einhergehender Eosinophilie (z.B. Helmintheninfektion) nicht weiter abgeklärt. Häufiger jedoch fanden sich sehr niedrige Zellzahlen an Eosinophilen bei den gesunden Probanden, was die Arbeit mit diesem Zelltyp erschwerte. Die Nutzung bzw. das Führen eines Registers für die Rekrutierung von gesunden Probanden mit (1) einer ausreichenden Zellzahl und (2) nachgewiesenem Ausschluss anderer Erkrankungen wäre für die Erforschung von Eosinophilen im größeren Rahmen empfehlenswert.

Die Inkubationszeiten der direkt im Anschluss an die Blutentnahmen aufbereiteten Eosinophilen wurden von uns auf 6 bis 24 h begrenzt. Langzeitkulturen über die 24 h hinaus gestalteten sich aufgrund der abnehmenden *in vitro* Viabilität von Eosinophilen mit zunehmender Zeit und ohne entsprechende Überlebensfaktoren als schwierig. Späte, transkriptionelle Effekte auf mRNA Ebene (nach 24 h) wie bei IL-18 in Kapitel 3.1.1 wurden unter anderem aus diesem Grund nicht auf Proteinebene weiterverfolgt.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Histamin wurde aufgrund seines vermehrten Vorkommens in der Haut von AD-Patienten bereits in den 1960er Jahren als relevanter Mediator für die Entstehung einer AD identifiziert und ist seither zentraler Bestandteil der AD-Forschung (Johnson et al., 1960; Juhlin, 1967). Mit der Entdeckung der verschiedenen Histamin-Rezeptoren (H_1R – H_4R) folgte eine Vielzahl an Untersuchungen zu den rezeptorspezifischen Effekten auf die in der AD involvierten Zelltypen (Leukozyten, Nervenzellen, Keratinozyten). Auf Eosinophilen von AD-Patienten konnte von unserer Arbeitsgruppe der H_2R sowie der H_4R nachgewiesen werden (Schaper-Gerhardt et al., 2020b), wobei ein Screening die Erhöhung der IL-18 und IL-18 α mRNA-Expression in Eosinophilen durch Histamin- und H_4R -Stimulation hervorbrachte (Beyer et al., 2022). Diese angeschlossene Studie veranschaulicht den Einfluss von Histamin, dem H_2R und dem H_4R sowie

Th₁- und Th₂-assoziierten Zytokinen auf die Regulation von IL-18 und dem IL-18R α auf humanen Eosinophilen von AD-Patienten und nicht-atopischen Kontrollprobanden.

4.3.1 Einfluss von Histamin auf IL-18 und den IL-18R α auf Eosinophilen

Eosinophile von AD-Patienten reagierten auf die Stimulation mit Histamin mit einer signifikanten Steigerung der IL-18 und IL-18R α mRNA Expression, welche über eine H₂R-Stimulation reproduziert werden konnte und sich für den IL-18R α auch auf Proteinebene nachweisen ließ. Der H₄R führte ebenso zu einer signifikanten Erhöhung der IL-18 mRNA Expression, wobei eine Beeinflussung der IL-18R α Expression primär nur auf mRNA-Ebene zu sehen war. IL-18 ist als pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin bekannt, welches in der Pathogenese der AD involviert ist und zum Großteil von Makrophagen, Keratinozyten und Endothelzellen produziert wird (Yasuda et al., 2019). Im Rahmen der AD lag das Augenmerk für Untersuchungen zu IL-18 bisher vor allem auf den Keratinozyten, welche in einem transgenen Mausmodell von Konishi et al. durch eine Überproduktion von IL-18 die spontane Entwicklung von AD-ähnlichen Hautläsionen bewirkten (Mausmodell mit KCASP1Tg [Caspase-1-überexprimierende Keratinozyten] und KIL-18Tg [reifes IL-18 exprimierende Keratinozyten]) (Konishi et al., 2002). Als Auslöser für eine erhöhte IL-18-Produktion von Keratinozyten konnte von Terada et al. die Besiedlung der Haut durch *S. aureus* identifiziert werden. Sie beobachteten, dass die Applikation von *S. aureus* Protein A auf die gestörte Hautbarriere von Mäusen zur Entstehung einer mit erhöhten IL-18-Spiegeln einhergehenden, moderaten bis schweren AD führte, welche sich durch die Blockade von IL-18 verhindern ließ (Terada et al., 2006). Im Einklang mit Letzterem stehen aktuelle Ergebnisse von Chen et al., in denen sich exogen provozierte Hautläsionen von Mäusen unter vollkommener Abwesenheit von IL-18 (IL-18-knockout-Modell) im Vergleich zur Kontrolle verbesserten (Chen et al., 2020). Wesentlich an der Rolle von IL-18 in der AD ist, dass es Hautläsionen unabhängig von IgE bzw. einer allergischen Sensibilisierung verursachen kann (Konishi et al., 2002). Dies könnte darin begründet liegen, dass Mastzellen und Basophile, die als Ausgangspunkt einer allergischen Reaktion vom Soforttyp bei Antigenkontakt IgE-vermittelt degranulieren, durch IL-18 zusammen mit IL-3 *direkt* zur Freisetzung von Histamin (und auch von IL-4 und IL-13) angeregt werden können (Nakanishi, 2018; Yoshimoto et al., 1999).

Wir konnten nun zeigen, dass Histamin umgekehrt zur Produktion von IL-18 über Eosinophile beiträgt und die proinflammatorischen Effekte von IL-18 in der AD sowohl über H₂R- als auch H₄R-Stimulation gefördert werden. Die bisherigen Erkenntnisse zum Ursprung von IL-18 in der AD werden durch unsere Beobachtungen zur (1) konstitutiven Expression von IL-18 durch Eosinophile und der (2) Hochregulation in Präsenz von Histamin bei AD-Patienten erweitert. Darüber hinaus aber scheinen Eosinophile mehr als nur die vorrangige Funktion einer enddifferenzierten Effektorzelle, welche durch Degranulation zu lokaler Gewebedestruktion

führt, in der AD einzunehmen. Der fehlende Einfluss von Histamin auf die Eosinophilen von gesunden Probanden verdeutlicht das Vorliegen eines Pathomechanismus.

Auch in anderen für die AD relevanten Zellen konnten proinflammatorische Reaktionen durch Histamin über den H₄R bzw. H₂R festgestellt werden. Insbesondere der H₄R war über die letzten zwei Jahrzehnte aufgrund seiner diversen juckreiz- und entzündungsfördernden Effekte unter den Histamin-Rezeptoren hervorgetreten, wie in Abbildung 2 bereits im Detail dargestellt wurde (Schaper-Gerhardt et al., 2018). Untersuchungen zum H₂R aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass dieser die IL-4- oder IL-13-induzierte mRNA und Protein Expression des Chemokins CCL17 in M2 Makrophagen potenziert. M2 Makrophagen werden über die Sekretion von CCL17 und CCL22 charakterisiert, wobei CCL17 bei AD-Patienten vermehrt exprimiert ist und die Serumspiegel mit dem Schweregrad der AD korrelieren (Mommert et al., 2018b). Darüber hinaus wurde in einer älteren Studie bereits berichtet, dass Histamin in PBMCs von gesunden Probanden die IL-18-Produktion induziert und dieser hochregulatorische Effekt durch die H₂R-Antagonisten Famotidin und Ranitidin inhibiert werden konnte (Kohka et al., 2000). Der erst im Jahr 2000 entdeckte H₄R wurde zum damaligen Zeitpunkt nicht untersucht. Äquivalent dazu nimmt der H₂R auch Einfluss auf die Expression von IL-18 in Eosinophilen (zählen nicht zu den PBMCs, siehe 2.3.1), wie wir nun feststellen konnten, und beeinflusst damit in ihnen ein für die AD ebenso wesentliches proinflammatorisches Zytokin wie das CCL17 in Makrophagen. Diese Ergebnisse machen die Beteiligung des H₂R in den pathologischen Vorgängen einer AD deutlich, auch wenn ein klinischer Nutzen von selektiven H₂R-Antagonisten nicht erwiesen wurde (Gutzmer et al., 2011; Werfel et al., 2018). Es lässt sich ableiten, dass die Effekte des H₂R zwar nicht führend in die Pathogenese der AD sind, sie aber dennoch beeinflussen und eine gemeinsame Blockade z.B. des H₂R und des H₄R in der AD sinnvoll sein könnte.

Auf Proteinebene mittels ELISA ließen sich die Ergebnisse der mRNA-Ebene nicht verifizieren. Die Konzentration an IL-18 in den Überständen lag unterhalb des vom Hersteller angegebenen Detektionslimits. Ein Erklärungsansatz dafür könnte sein, dass Eosinophile das IL-18 Protein erst mit dem Zelltod freisetzen, sodass es zum Zeitpunkt der Messungen noch intrazellulär vorlag. Dies berichteten Dinarello et al. über Monozyten/Makrophagen, welche nur einen Bruchteil des von ihnen synthetisierten Pro-IL-18 während ihrer Lebenszeit prozessieren und freisetzen. Über 80% verbleiben bei ihnen als inaktives Vorläufermolekül in der Zelle und werden erst mit dem Zelltod freigegeben (Dinarello et al., 2013). Eosinophile sterben in der Haut von AD-Patienten über den Mechanismus der zytolytischen Degranulationen, worauf anhand der extrazellulären Ablagerungen von intakten, Membran-gebundenen Granulaproteinen geschlossen werden kann, wie sie im Gewebe bei AD vorkommen (Ueki et al., 2013). In unseren Untersuchungen fand jedoch keine Inkubation der Eosinophilen bis zum Zelltod hin statt, sodass diese Möglichkeit der Freisetzung weiterhin denkbar bleibt.

Für den IL-18R α hingegen ließ sich die Hochregulation auf mRNA-Ebene durch Histamin- und H₂R-Stimulation auch auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie nachweisen. Der IL-18R α stellt die Zielstruktur von IL-18 dar und ist der Ausgangspunkt für die Vermittlung seiner pleiotropen Effekte auf zellulärer Ebene (Nakanishi et al., 2001). Er bildet im Heterodimer mit dem IL-18R β (= β -Kette) einen hochaffinen Rezeptorkomplex und kann über seine Expression auf verschiedenen Immunzellen sowohl die Entstehung eines Th₁- als auch Th₂-Zytokinmilieus bewirken (Sanders und Mishra, 2016). Auf Immunzellen von gesunden Probanden wurde die Regulation der IL-18R α Expression bereits in einigen Studien untersucht. Auf T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beispielsweise wird der IL-18R α durch IFN- α und IL-12 hochreguliert (Kunikata et al., 1998; Sareneva et al., 2000), auf B-Zellen ebenfalls durch IL-12 (Yoshimoto et al., 1998). Auf Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen zeigte INF- γ einen hochregulatorischen Effekt (Gutzmer et al., 2003). Die bis zu diesem Zeitpunkt identifizierten Induktoren INF- γ , IFN- α und IL-12 wiesen lange auf eine Hochregulation des IL-18R α ausschließlich unter dem Zytokinmilieu von Th₁-Zellen hin, wie es in der chronischen Phase einer AD vorliegt. Während der H₄R auf verschiedenen Zellen durch Th₂-Zytokine induziert wird (Gutzmer et al., 2009; Mommert et al., 2018a; Schaper-Gerhardt et al., 2020b) und so mit Th₂-Konditionen in Verbindung zu bringen ist, dient der H₂R auf Th₂-Zellen der Unterdrückung einer Th₂-Reaktion (Gutzmer et al., 2009). Diese Zusammenhänge machen besser verständlich, weshalb es der H₂R ist, der von uns für die Histamin-induzierte Hochregulation des IL-18R α unter neutralen Inkubationsbedingungen (ohne Zugabe von Zytokinen) identifiziert wurde.

Interessanterweise weist der IL-18R α mit dem antiinflammatorischen IL-37 einen weiteren Liganden neben dem proinflammatorischen IL-18 auf. Auch dieses Zytokin konnte durch erniedrigte Serumspiegel bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden mit der AD assoziiert werden (Hou et al., 2021). IL-37 bindet ebenso wie IL-18 an den IL-18R α , wobei dieser jedoch anschließend mit dem IL-18 heterodimerisiert (Nold-Petry et al., 2015). Da Histamin in unseren Untersuchungen die Expression von IL-18 durch Eosinophile hochregulierte, ergab sich die Überlegung, ob Histamin, H₂R- oder H₄R-Agonisten auch einen Einfluss auf seinen Gegenspieler IL-37 haben. Hierbei zeigte sich jedoch keine Regulation durch Histamin.

4.3.2 Einfluss von Histamin mit INF- γ / IL-5 auf den IL-18R α auf Eosinophilen

Die AD zeichnet sich durch den Wechsel zwischen einem Th₁-dominierten Zytokinmilieu in der chronischen Phase und einem Th₂-dominierten Milieu in der akuten Phase aus (David Boothe et al., 2017), von dem Eosinophile in den inflammatorischen Hautläsionen umgeben sind. Um weitere Erkenntnisse zur Regulation des IL-18R α Protein auf Eosinophilen von AD-Patienten im Vergleich zu Gesunden zu erhalten, ergänzten wir daher die Experimente um Th₁- und Th₂-assoziierte Zytokine. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu dendritischen Zellen (Gutzmer et al., 2003) konnten wir nun auch auf Eosinophilen von AD-

Patienten eine IFN- γ -vermittelte Hochregulation der IL-18R α Protein Expression detektieren. Kombiniert mit Histamin zeigte sich bei AD-Patienten und bei gesunden Probanden ein additiver Effekt der beiden Stimulanzen. Dabei wurde der Histamineffekt wie zuvor über den H₂R vermittelt. Die Steigerung der IL-18R α Expression durch IFN- γ lässt auf einen Verstärkermechanismus der IL-18-Aktivität schließen. Denn IFN- γ selbst wird besonders potent durch IL-18, den sogenannten „*IFN- γ inducing factor*“, induziert (Dinarello et al., 2013). Kohka et al. berichteten außerdem, dass Histamin über den H₂R auf humanen PBMCs signifikant die IFN- γ Protein Expression erhöht (Kohka et al., 2000). Das wechselseitige Zusammenspiel bzw. Hochregulieren von Histamin, IFN- γ und IL-18 veranschaulicht die Stärke des IL-18R α -induzierenden Stimulus, welcher auf Eosinophile im Entzündungsgeschehen der chronischen AD einwirkt.

Anknüpfend an die weiteren Untersuchungen mit Th₂-assoziierten Zytokinen stellten wir interessanterweise fest, dass es durch IL-5 zu einer signifikanten Herunterregulation des IL-18R α auf Eosinophilen von AD-Patienten kam. Diese Beobachtung ist bisher weder für Eosinophile, noch für andere Zelltypen in der Literatur beschrieben. IL-5 ist von zentraler Bedeutung für die Reifung, Differenzierung und das Überleben von Eosinophilen und bei AD-Patienten sowohl in der Haut als auch im Serum in erhöhten Konzentrationen zu finden (Gürkan et al., 2016; Leung et al., 2004; McAleer et al., 2019). Hierin könnte eine Erklärung für die niedrigere Basisexpression des IL-18R α auf Eosinophilen aus dem Blut von AD Patienten im Vergleich zu den Kontrollen liegen, die in dieser Arbeit gesehen wurde. Auch die konstitutionelle Expression von IL-18 in Eosinophilen von AD-Patienten zeigte sich signifikant niedriger als im Vergleich zu Gesunden. Parallel zu unseren Forschungsarbeiten veröffentlichten auch Hou et al. die Entdeckung über eine erniedrigte Basisexpression des IL-18R α auf CCR3-positiven Blutzellen (Eosinophilen) von AD-Patienten, ohne jedoch einen Grund dafür zu eruieren (Hou et al., 2021). Wir spekulieren, dass der Grund bei IL-5 liegt, wobei sich diese Hypothese bei fehlender Datenlage nur auf die Ergebnisse unserer eigenen Untersuchungen stützt. Der Hintergrund könnte möglicherweise in einem antagonistischen Verhältnis von IL-5 zu IL-18 liegen: Wie Venkateshaiah et al. berichteten ist IL-18 in der Lage, IL-5-abgeleitete Eosinophile in eine pathogene, CD101⁺ und CD274⁺ Untergruppe zu transformieren (Venkateshaiah et al., 2018). Die vermehrte Expression von CD274 (PD-L1) stellt einen Flucht-Mechanismus vor einer durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Apoptose dar (Jiang et al., 2019). IL-18-differenzierte Eosinophile unterscheiden sich in vielen Merkmalen (z.B. Größe, Granulagehalt) von den „physiologischen“ IL-5-differenzierten Eosinophilen und wurden im Gewebe von Patienten mit eosinophiler Ösophagitis und allergischem Asthma nachgewiesen (Venkateshaiah et al., 2018). In Zusammenschau dieser Kenntnisse könnte die Herunterregulation des IL-18R α durch IL-5 auf „normalen“ IL-5-differenzierten Eosinophilen somit dem Schutz vor einem pathologischen Einfluss durch IL-18 dienen.

In der AD ist das Vorkommen der pathologischen Subgruppe an Eosinophilen bisher jedoch nicht bekannt. Wir griffen daher die Frage nach der Expression von CD274 (PD-L1) auf Eosinophilen von AD-Patienten auf und führten Experimente auf mRNA- und Proteinebene durch. Die Detektion von CD274 war allerdings sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nur sehr unregelmäßig möglich. Es ist zu überlegen, ob sich die Expression von CD274 (PD-L1) erst durch das lokale Zytokinmilieu im entzündeten Gewebe der Haut vollzieht. Dies würde insbesondere vor dem Hintergrund Sinn ergeben, dass Eosinophile vermutlich erst nach Migration in die Hautläsionen - also unter dem lokalen Einfluss von starken Induktoren wie Histamin und IFN- γ - den IL-18R α hochregulieren. Da in dieser Arbeit Eosinophile aus der Blutbahn noch vor der Migration ins Gewebe genutzt wurden, ist trotz der fehlenden Detektion von CD274 unsererseits diese Theorie weiterhin denkbar. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese Fragestellung abzuklären.

Passend dazu stellten wir jedoch fest, dass die IL-5-induzierte Herunterregulation der IL-18R α Protein Expression durch Histamin vollständig aufgehoben werden konnte, wobei der Effekt über eine H₄R-Stimulation reproduzierbar war. Letzteres steht im Kontrast zu den vorherigen Untersuchungen, in denen Histamin seinen Einfluss auf den IL-18R α immer über den H₂R vermittelte. Ein Erklärungsansatz dafür könnte sein, dass IL-5 die H₄R mRNA Expression auf Eosinophilen signifikant hochreguliert (Schaper-Gerhardt et al., 2020b) und sich der Effekt von Histamin dadurch zugunsten des H₄R verschiebt. Insgesamt erscheint die Effektstärke von Histamin bei Kombination mit IL-5 noch ausgeprägter als zuvor, was in der Amplifikation des Histamineffekts durch den hochregulierten H₄R begründet sein könnte. Ungeachtet dieser Überlegung konnten wir an dieser Stelle aber in jeden Fall herausstellen, dass beide der auf Eosinophilen exprimierten Histaminrezeptoren (H₂R und H₄R) simultan an der Vermittlung des Histamineffekts auf den IL-18R α beteiligt sein können. Neben den vorliegenden Ergebnissen zur Regulation von IL-18 durch beide genannten Histaminrezeptoren wurde eine gemeinsame Beteiligung dieser weiterhin für die Expression von IL-27 in Antigen-präsentierenden Zellen nachgewiesen (Gschwandtner et al., 2012).

Durch die Stimulation mit IL-4 oder IL-13 konnten wir keine Unterschiede bezüglich der IL-18R α Protein Expression im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollen detektieren.

4.3.3 Korrelationen von IL-18 und dem IL-18R α mit dem Krankheitsgeschehen

Histamin ist ein potenter Induktor von IL-18 und dem IL-18R α auf Eosinophilen von AD-Patienten, wie Kohka et al. für IL-18 bereits auf PBMCs von Gesunden beobachten konnten (Kohka et al., 2000). Wir stellten nun fest, dass das Ausmaß des Histamineffekts auf die Hochregulation der IL-18R α Protein auf Eosinophilen von AD-Patienten und Gesunden positiv mit dem Anteil an Eosinophilen im Blut der Probanden korreliert. Patienten mit AD weisen bekanntermaßen in Abhängigkeit vom Schweregrad ihrer Erkrankung erhöhte Zahlen an

Eosinophilen im Blut auf (Kägi et al., 1992). Je höher also der Anteil an Eosinophilen im Blut von AD-Patienten und damit der Schweregrad ist, desto stärker lässt sich auf Eosinophilen die Expression des IL-18R α durch Histamin induzieren. Damit einhergehend steigt auch der Einfluss von IL-18 auf Eosinophile. Bei Patienten mit besonders hohen Zahlen an Eosinophilen im Blut wäre folglich am ehesten eine Induktion des pathologischen Subtyps mit CD101 und CD274 (PD-L1) Expression zu erwarten. Bei diesem Eosinophilensubtyp konnte eine vermehrte Ansammlung zytotoxischer Granula, eine Größenzunahme sowie eine gesteigerte Degranulation beobachtet werden (Venkateshaiah et al., 2018).

Weiterhin korrelierte auch die IL-18 mRNA Induktion durch Histamin im Trend positiv mit dem prozentualen Anteil an Eosinophilen im Blut von AD-Patienten und ihrem SCORAD. Auch hierin liegt ein Hinweis auf die Zunahme der Pathogenität von Eosinophilen bei besonders schwer betroffenen AD-Patienten. Eine erhöhte Expression von IL-18 konnte neben der AD auch in allergischer Rhinitis und eosinophiler Ösophagitis mit dem Anteil an Eosinophilen positiv korreliert werden (Lin et al., 2005; Niranjana et al., 2015).

4.3.4 Einfluss von IL-18 auf den IL-18R α

Ebenfalls stellte sich die Frage, ob IL-18 seinen eigenen Rezeptor reguliert. In unseren Messungen ließ sich jedoch kein Unterschied in der IL-18R α Protein Expression zwischen IL-18-stimulierten und nicht-stimulierten detektieren, sodass der Ansatz nicht weiterverfolgt wurde. Ähnlich dazu wurde auch auf BALF (*bronchoalveolar lavage fluid*) Mastzellen und Blut-Basophilen aus einem Asthmadmodell mit OVA-sensibilisierten Mäusen kein signifikanter Unterschied in der IL-18R α Protein Expression durch IL-18 Stimulation gefunden (Wang, Z. et al., 2018).

4.3.5 Funktionalität des IL-18R

Der IL-18R vermittelt über die Bindung von IL-18 pathogenitätssteigernde Effekte auf Eosinophilen (Venkateshaiah et al., 2018). Verschiedene Stimuli wurden experimentell in der vorliegenden Doktorarbeit für die Regulation der IL-18R α (α -Kette des IL-18R) Expression untersucht, darunter insbesondere Histamin. Die Kombination aus Histamin und IFN- γ stellte sich dabei als starker IL-18R α -Induktor heraus. Infolge dessen überprüften wir, ob die Hochregulation der IL-18R α Expression durch diese beiden Stimuli auch einen funktionellen Einfluss auf die Aktivität der Eosinophilen hat. Es zeigte sich, dass IL-18 stimulierte Eosinophile, deren IL-18R α Expression zuvor durch eine Präinkubation mit Histamin + IFN- γ hochreguliert wurde, eine gesteigerte Expression an ECP und EDN mRNA im Vergleich zu den nicht mit IL-18 stimulierten Zellen aufwiesen. Dies demonstriert die Funktionalität des IL-18R auf Eosinophilen und weist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Venkateshaiah et al. auf die gesteigerte Produktion der zytotoxischen Granulaproteine hin (Venkateshaiah et al., 2018). Der IL-18R α wurde folglich

nicht nur hochreguliert, sondern zeigte auch unter Kulturbedingungen seine proinflammatorische Aktivität.

4.3.6 Einfluss von Histamin mit IFN- γ und IL-5 auf die Aktivität von Eosinophilen

Da wir beobachten konnten, dass Histamin zu einer Hochregulation des IL-18R α /IL-18-Komplexes sowie zu einer gesteigerten proinflammatorischen Aktivität von Eosinophilen führt, stellte sich uns die Frage, ob Histamin einen generellen Einfluss auf die Aktivierung von Eosinophilen besitzt. Funktionelle Untersuchungen des H₄R auf Eosinophilen lieferten nach seiner Identifizierung im Jahr 2000 zahlreiche Hinweise für eine aktivierende Wirkung. Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten über eine H₄R-vermittelte Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Formveränderungen, Calciuminflux und Chemotaxis von Eosinophilen (Buckland et al., 2003; Grosicki et al., 2016; Ling et al., 2004; Reher et al., 2012). Da sich jedoch keine Produktion von Sauerstoffradikalen oder Degranulation fand, wurde der H₄R als partieller Aktivator betitelt (Reher et al., 2012). Diese Funktion konnte zuletzt auch *in vivo* in einem transgenen Mausmodell nachgewiesen werden (Schirmer et al., 2018). CD69 ist ein Oberflächenmolekül, welches von einer Reihe an Zellen exprimiert werden kann und als eines der frühesten Aktivierungszeichen gilt (Ziegler et al., 1994). Aus diesem Grund führten wir Untersuchungen zum Aktivierungsmarker CD69 durch.

Im Kontrast zu den bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen stellten wir in unseren Messungen fest, dass Histamin auf Eosinophilen von AD-Patienten eine leichte, aber signifikante Herunterregulation des Aktivierungsmarkers CD69 induziert. Auch bei Gesunden war diese Tendenz feststellbar. Aufgrund der geringen Effektstärke ist zwar von keiner biologischen Relevanz der Herunterregulation auszugehen, aber dennoch zeigt dieses Ergebnis, dass Histamin allein unter neutralen Bedingungen nicht für die Expression von CD69 auf Eosinophilen ausreicht. Im Gegensatz dazu konnten wir jedoch zeigen, dass IL-5 die CD69 Protein Expression induziert und dass diese Aktivierung über eine Stimulation des H₄R noch weiter verstärkt werden kann. Auch in Kombination mit IFN- γ führte Histamin zu einer signifikanten Potenzierung der CD69 Protein Expression im Vergleich zu IFN- γ allein.

Das IL-5 und IFN- γ jeweils die CD69 Protein Expression signifikant steigern, ist bereits bekannt und ließ sich in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien reproduzieren. Für die Induktion von CD69 auf Eosinophilen sind bislang folgende Stimuli bekannt: IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, INF- α , IFN- γ , GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor), PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), Phospholipase A₂ und Lysophosphatidsäure (Hartnell et al., 1993; Urasaki et al., 2001; Wang, H. et al., 2006). Die beiden Zytokine IL-4 und IL-13 zeigten in unseren Versuchen keinen Effekt auf die CD69 Expression, wobei ihr Einfluss in der Literatur auch nur als schwach beschrieben wurde (Urasaki et al., 2001). Ob die potenzierte CD69 Protein Expression durch den H₄R auch funktionelle Effekte auf Eosinophilen hat, muss vor diesem

Hintergrund unter Berücksichtigung AD-assoziiierter Mediatoren neu evaluiert werden. Da das Ausmaß der CD69 Expression jedoch als Biomarker für die eosinophile Entzündung herangezogen werden kann (Dahl et al., 2004), wird nichtsdestotrotz die klare proinflammatorische Wirkung von Histamin in Kombination mit IL-5/IFN- γ deutlich.

Vom Mechanismus her könnte der Potenzierung, welche bei IL-5 nachweislich über den H₄R-vermittelt wurde, eine Verstärkung der Signaltransduktion für die CD69 Expression zugrunde liegen. Diese verläuft für den Effekt von IL-5 über den Arachidonsäure-Metabolismus, genauer den 5-Lipoxygenase-Pfad. Die Phospholipase A₂ und 5-Lipoxygenase stellen hierin Schlüsselenzyme für die IL-5-vermittelte CD69 Induktion auf Eosinophilen dar (Urasaki et al., 2001). Möglicherweise führt Histamin zu einer Induktion dieses Aktivierungspfades. Da der von uns beobachtete additive Effekt von Histamin recht ausgeprägt ist, wäre dieser als Ausgangspunkt für ein neues Forschungsprojekt durchaus interessant.

Mit dem Fokus dieser Doktorarbeit auf IL-18 und den IL-18R α prüften wir auch Effekt von IL-18 auf die CD69 Protein Expression. Wir stellten fest, dass IL-18 die Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten und gesunden Probanden nicht beeinflusst. Die Kombination mit weiteren Stimuli (Histamin, ST-1006, Amthamin, IFN- γ) erbrachte keine Veränderung des Effekts.

4.3.7 Zusammenfassung

Zusammengefasst demonstrierten wir in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von Histamin auf die Regulation von IL-18 und dem IL-18R α auf Eosinophilen von AD-Patienten und gesunden Probanden unter neutralen Inkubationsbedingungen oder in Th₁-/Th₂-dominierten Zytokinmilieus. Es ließ sich zeigen, dass sowohl der H₂R, als auch der H₄R in Abhängigkeit von den Umgebungsfaktoren an der Regulation des IL-18R α beteiligt sind und über ihn eine Aktivierung der Eosinophilen von AD-Patienten vermittelt wird. Letztere konnten wir über die erhöhte Produktion der Granulaproteine ECP und EDN sowie über die Induktion des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Zelloberfläche der Eosinophilen nachweisen. Mit Blick auf diese Ergebnisse wird deutlich, dass Histamin die inflammatorischen Prozesse in der Haut von AD-Patienten über die Eosinophilen wesentlich vorantreibt und der Forschung an klinischen Wirkstoffen für die Behandlung einer AD nach wie vor großes Augenmerk zukommen sollte.

5 Zusammenfassung

Die Atopische Dermatitis (AD) ist eine häufige, chronisch-inflammatorische Hauterkrankung, die bundesweit etwa 23% der Säuglinge und Kleinkinder, 8% der Schulkinder und bis zu 4% der Erwachsenen betrifft. Trotz der hohen Prävalenz ist die Pathogenese der AD noch nicht vollständig verstanden, auch weil es sich um ein multifaktorielles und interindividuell unterschiedliches Krankheitsbild handelt (Werfel et al., 2016b). Inflammation und Pruritus werden auf immunologischer Ebene durch die Aktivität von T-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen, Mastzellen sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten (Eosinophile, Basophile) im kutanen Zellinfiltrat unterhalten (Leung et al., 2004). Histamin ist ein primär durch Mastzellen und Basophile freigesetztes Gewebehormon (Simons und Simons, 2011), welches aufgrund seiner hohen Konzentrationen in den Hautläsionen von AD-Patienten ins Blickfeld der Therapie- und Grundlagenforschung rückte (Johnson et al., 1960; Juhlin, 1967). Dabei stellte sich der zuletzt entdeckte Histamin-4-Rezeptor (H₄R) in einer Vielzahl an Untersuchungen über die Vermittlung von Entzündung und Juckreiz als für die AD relevant heraus (Schaper-Gerhardt et al., 2020a). Klinische Phase 2 Studien konnten den Nutzen von H₄R-Antagonisten in der Behandlung von AD bereits untermauern (Murata et al., 2015; Werfel et al., 2018). Erst kürzlich berichteten wir, dass der H₄R signifikant höher auf Eosinophilen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden exprimiert ist (Schaper-Gerhardt et al., 2020b). Aus diesem Grund ist eine besondere Funktion des H₄R auf Eosinophilen im Kontext der AD naheliegend. Da die immunmodulatorischen Folgen einer H₄R-Stimulation auf Eosinophilen jedoch noch weitgehend unerforscht sind, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Transkriptom-Analyse mit Histamin- und ST-1006- (H₄R-Agonist) stimulierten Eosinophilen von AD-Patienten durchgeführt. Die Analyse des Transkriptoms zeigte eine Hochregulation des für die AD relevanten Zytokins IL-18 und vom IL-18R α durch Histamin und ST-1006 (Beyer et al., 2022). Basierend auf diesem Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Histamin auf die Expression und Regulation von IL-18 und dem IL-18R α auf humanen Eosinophilen tiefergehend untersucht.

Dazu wurden Eosinophile aus venösem Vollblut von insgesamt 35 AD-Patienten und 22 gesunden Probanden mittels Dichtegradientenzentrifugation, Erythrozytenlyse und Negativselektion isoliert. Anschließend wurden die extrahierten Eosinophilen mit Histamin, H₄R-Agonisten/Antagonisten, H₂R-Agonisten/Antagonisten sowie Th₁- und Th₂-assoziierten Zytokinen (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13) stimuliert und zwischen 6–24 h inkubiert. Die Untersuchungen zu IL-18 und dem IL-18R α erfolgten auf mRNA-Ebene nach vorangegangener Zelllyse, RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und ELISA. Ergänzend dazu wurde die Expression und Regulation des Aktivierungsmarkers CD69 auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie untersucht.

In dieser Studie konnten wir erstmalig zeigen, dass die Expression von IL-18, dem IL-18R α und von CD69 durch Histamin reguliert werden. Die IL-18 mRNA Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten wurde durch Histamin signifikant gesteigert, wobei der Effekt sowohl durch den H₄R-Agonisten ST-1006 als auch den H₂R-Agonisten Amthamin reproduzierbar war. Auch die Expression des IL-18R α auf Eosinophilen von AD-Patienten ließ sich auf mRNA-Ebene durch Histamin signifikant erhöhen. Auf Proteinebene bestätigte sich, dass der Histamineffekt H₂R-vermittelt war. Darüber hinaus korrelierte das Ausmaß der Histamin-induzierten Hochregulation des IL-18R α Protein signifikant mit dem Anteil an Eosinophilen im Blut von AD-Patienten und gesunden Probanden. Weiterhin konnten wir feststellen, dass Histamin über den H₂R signifikant die hochregulatorische Wirkung von IFN- γ auf die IL-18R α Expression verstärkt und über den H₄R den herunterregulatorischen Effekt von IL-5 aufhebt. Dass IL-5 die Expression des IL-18R α herunterreguliert, passt zu unserer Beobachtung, dass die Basisexpression vom IL-18R α , aber auch von IL-18, auf Eosinophilen von AD-Patienten im Vergleich zur nicht-atopischen Kontrollgruppe erniedrigt war, da bekanntermaßen die Konzentration von IL-5 im Serum von AD-Patienten erhöht ist.

Unsere Untersuchungen zur funktionellen Aktivität des IL-18R α auf Eosinophilen ergaben im Trend eine IL-18-induzierte Steigerung der EDN und ECP mRNA Expression in Histamin + IFN- γ -präinkubierten Zellen. Darüber hinaus zeigte Histamin einen geringen herunterregulatorischen Effekt auf die CD69 Protein Expression auf Eosinophilen von AD-Patienten. Im Gegensatz dazu führte Histamin jedoch zu einer Potenzierung der IFN- γ -vermittelten Steigerung der CD69 Protein Expression. Auch die Hochregulation der CD69 Expression durch IL-5 konnte durch Histamin über den H₄R signifikant amplifiziert werden, was verdeutlicht, dass Histamin in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu verschiedene Funktionen hat.

Zusammengefasst konnten wir nachweisen, dass Histamin eine maßgebliche Rolle in der Hochregulation des proinflammatorischen Zytokins IL-18 und von seinem Rezeptor auf Eosinophilen von AD-Patienten spielt. Der überwiegende Teil der beobachteten Effekte war auf die Funktion des H₂R zurückzuführen. Im Zusammenhang mit dem Th₂-assoziierten Zytokin IL-5 jedoch konnte interessanterweise der H₄R für die Histamin-induzierten Effekte auf die IL-18R α und die CD69 Protein Expression identifiziert werden. Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Eosinophile über Histamin aktiviert werden und die Regulation von IL-18 und dem IL-18R α über beide Histamin-Rezeptoren in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu (Th₁/Th₂) gesteuert wird. Über diese Funktion ist Histamin in der Lage, sowohl das akute, als auch das chronische Entzündungsgeschehen in der AD über Eosinophile zu intensivieren.

6 Literaturverzeichnis

- Alpert, A., Pickman, Y., Leipold, M., Rosenberg-Hasson, Y., Ji, X., Gaujoux, R., Rabani, H., Starosvetsky, E., Kveler, K., Schaffert, S., Furman, D., Caspi, O., Rosenschein, U., Khatri, P., Dekker, C.L., Maecker, H.T., Davis, M.M., and Shen-Orr, S.S. (2019). A clinically meaningful metric of immune age derived from high-dimensional longitudinal monitoring. *Nat Med* 25, 487. DOI: 10.1038/s41591-019-0381-y
- Bell, J.K., McQueen, D.S., and Rees, J.L. (2004). Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in BalbC mice. *British Journal of Pharmacology* 142, 374-380. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705754
- Beyer, L., Kabatas, A.S., Mommert, S., Stark, H., Werfel, T., Gutzmer, R., and Schaper-Gerhardt, K. (2022). Histamine Activates Human Eosinophils via H2R and H4R Predominantly in Atopic Dermatitis Patients. *Ijms* 23, 10294. DOI: 10.3390/ijms231810294
- Bieber, T., and Novak, N. (2004). Pathophysiologie der Atopischen Dermatitis. *Dtsch Arztebl* 101, 108-120. DOI: 10.1111/ddg.13819_g
- Bieber, T. (2022). Atopic dermatitis: an expanding therapeutic pipeline for a complex disease. *Nat Rev Drug Discov.* 21, 21-40. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00266-6>
- Buckland, K.F., Williams, T.J., and Conroy, D.M. (2003). Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H4 receptor. *British Journal of Pharmacology* 140, 1117-1127. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705530
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6, 328-340. DOI: 10.1038/nrm1619
- Chen, J.L., Niu, X.L., Gao, Y.L., Ma, L., Gao, X.H., Chen, H.D., and Qi, R.Q. (2020). IL-18 knockout alleviates atopic dermatitis-like skin lesions induced by MC903 in a mouse model. *Int J Mol Med.* 46, 880-888. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4630
- Cogé, F., Guénin, S., Rique, H., Boutin, J.A., and Galizzi, J. (2001). Structure and Expression of the Human Histamine H4-Receptor Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 301-309. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4976
- Cowden, J.M., Zhang, M., Dunford, P.J., and Thurmond, R.L. (2010). The Histamine H4 Receptor Mediates Inflammation and Pruritus in Th2-Dependent Dermal Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 1023-1033. DOI: 10.1038/jid.2009.358
- Dahl, C., Hoffmann, H.J., Saito, H., and Schiøtz, P.O. (2004). Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. *Allergy (Copenhagen)* 59, 1087-1096. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2004.00606.x
- David Boothe, W., Tarbox, J.A., and Tarbox, M.B. (2017). Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol.* 1027, 21-37. DOI: 10.1007/978-3-319-64804-0_3
- de Esch, I., Thurmond, R.L., Jongejan, A., and Leurs, R. (2005). The histamine H₄ receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 26, 462-9. DOI: 10.1016/j.tips.2005.07.002

- Dinareello, C.A., Novick, D., Kim, S., and Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Frontiers in Immunology* 4, 289. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00289
- Drucker, A.M., Wang, A.R., Li, W., Severson, E., Block, J.K., and Qureshi, A.A. (2017). The Burden of Atopic Dermatitis: Summary of a Report for the National Eczema Association. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 26-30. DOI: 10.1016/j.jid.2016.07.012
- Dunford, P.J., O'Donnell, N., Riley, J.P., Williams, K.N., Karlsson, L., and Thurmond, R.L. (2006). The Histamine H4 Receptor Mediates Allergic Airway Inflammation by Regulating the Activation of CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* (1950) 176, 7062-7070. DOI: 10.4049/jimmunol.176.11.7062
- Fulkerson, P.C., and Rothenberg, M.E. (2018). Chapter One - Eosinophil Development, Disease Involvement, and Therapeutic Suppression. *Adv. Immunol.* 138, 1-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.001>
- Glatzer, F., PhD, Gschwandtner, M., PhD, Ehling, S., DVM, Rossbach, K., DVM, Janik, K., PhD, Klos, A., MD, Bäumer, W., DVM, Kietzmann, M., DVM, Werfel, T., MD, and Gutzmer, R., MD. (2013). Histamine induces proliferation in keratinocytes from patients with atopic dermatitis through the histamine 4 receptor. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132, 1358-1367. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.06.023
- Grosicki, M., Wójcik, T., Chlopicki, S., and Kieć-Kononowicz, K. (2016). In vitro study of histamine and histamine receptor ligands influence on the adhesion of purified human eosinophils to endothelium. *Eur J Pharmacol* 777, 49-59. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.02.061
- Gschwandtner, M., Bunk, H., Köther, B., Thurmond, R.L., Kietzmann, M., Werfel, T., Bäumer, W., and Gutzmer, R. (2012). Histamine down-regulates IL-27 production in antigen-presenting cells. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 21-29. DOI: 10.1189/jlb.0111017
- Gürkan, A., Yücel, A.A., Sönmez, C., Keleş, Ş, and Bostancı, İ. (2016). Serum Cytokine Profiles in Infants with Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 24, 268-273.
- Gutzmer, R., Diestel, C., Mommert, S., Köther, B., Stark, H., Wittmann, M., and Werfel, T. (2005). Histamine H4 Receptor Stimulation Suppresses IL-12p70 Production and Mediates Chemotaxis in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 174, 5224-5232. DOI: 10.4049/jimmunol.174.9.5224
- Gutzmer, R., Gschwandtner, M., Rossbach, K., Mommert, S., Werfel, T., Kietzmann, M., and Bäumer, W. (2011). Pathogenetic and therapeutic implications of the histamine H4 receptor in inflammatory skin diseases and pruritus. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 985-994. DOI: 10.2741/203
- Gutzmer, R., Langer, K., Mommert, S., Wittmann, M., Kapp, A., and Werfel, T. (2003). Human Dendritic Cells Express the IL-18R and Are Chemoattracted to IL-18. *The Journal of Immunology* (1950) 171, 6363-6371. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6363
- Gutzmer, R., Mommert, S., Gschwandtner, M., Zwingmann, K., Stark, H., and Werfel, T. (2009). The histamine H4 receptor is functionally expressed on TH2 cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, 619-625. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.12.1110
- Hartnell, A., Robinson, D.S., Kay, A.B., and Wardlaw, A.J. (1993). CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80, 281-286.

- Heinrich, P.C., Mueller, M., and Graeve, L. (2014). Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie. Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>
- Hofstra, C.L., Desai, P.J., Thurmond, R.L., and Fung-Leung, W. (2003). Histamine H4 Receptor Mediates Chemotaxis and Calcium Mobilization of Mast Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305, 1212-1221. DOI: 10.1124/jpet.102.046581
- Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., and Rothenberg, M.E. (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical and Experimental Allergy* 38, 709-750. DOI: 10.1111/j.13652222.2008.02958.x
- Hou, T., Tsang, M.S., Chu, I.M., Kan, L.L., Hon, K., Leung, T., Lam, C.W., and Wong, C. (2021). Skewed inflammation is associated with aberrant interleukin-37 signaling pathway in atopic dermatitis. *Allergy* 76, 2102-2114. DOI: 10.1111/all.14769
- Hu, Y., Wang, J., Zhang, H., Xie, H., Song, W., Jiang, Q., Zhao, N., and He, S. (2017). Enhanced Expression of IL-18 and IL-18BP in Plasma of Patients with Eczema: Altered Expression of IL-18BP and IL-18 Receptor on Mast Cells. *Mediators of Inflammation* 2017, 3090782-12. DOI: 10.1155/2017/3090782
- Inoue, Y., Aihara, M., Kirino, M., Harada, I., Komori-Yamaguchi, J., Yamaguchi, Y., Nagashima, Y., and Ikezawa, Z. (2011). Interleukin-18 is elevated in the horny layer in patients with atopic dermatitis and is associated with Staphylococcus aureus colonization. *British Journal of Dermatology* (1951) 164, 560-567. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.10145.x
- Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2007). Eosinophils and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 7, 18-26. DOI: 10.1007/s11882-007-0026-y
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C., and Zeng, Z. (2019). Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer* 18, 10. DOI: 10.1186/s12943-018-0928-4
- Johnson, H.H., Deoreo, G.A., Lascheid, W.P., and Mitchell, F. (1960). Skin histamine levels in chronic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 34, 237-238.
- Juhlin, L. (1967). Localization and content of histamine in normal and diseased skin. *Acta Derm Venereol* 47, 383-391.
- Kägi, M.K., Joller-Jemelka, H., and Wuethrich, B. (1992). Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology* 185, 88-92. DOI: 10.1159/000247419
- Kandikattu, H.K., Upparahalli Venkateshaiah, S., and Mishra, A. (2019). Synergy of Interleukin (IL)-5 and IL-18 in eosinophil mediated pathogenesis of allergic diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 47, 83-98. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.05.003
- Kapp, A., Czech, W., Krutmann, J., and Schöpf, E. (1991). Eosinophil cationic protein in sera of patients with atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 24, 555-558. DOI: 10.1016/0190-9622(91)70081-C
- Kita, H. (2013). Eosinophils: Multifunctional and Distinctive Properties. *International Archives of Allergy and Immunology* 161, 3-9. DOI: 10.1159/000350662

- Kohka, H., Nishibori, M., Iwagaki, H., Nakaya, N., Yoshino, T., Kobashi, K., Saeki, K., Tanaka, N., and Akagi, T. (2000). Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Immunology* 164, 6640-6646. DOI: 10.4049/jimmunol.164.12.6640
- Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanaka, K., Tanaka, M., Iwakura, Y., Suzuki, N., Takeda, K., Akira, S., Nakanishi, K., and Mizutani, H. (2002). IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11340-5. DOI: 10.1073/pnas.152337799
- Kunikata, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C., Yamauchi, H., Ikeda, M., Ikegami, H., and Kurimoto, M. (1998). Constitutive and Induced IL-18 Receptor Expression by Various Peripheral Blood Cell Subsets as Determined by Anti-hIL-18R Monoclonal Antibody. *Cellular Immunology* 189, 135-143. DOI: 10.1006/cimm.1998.1376
- Lee, J.H., Cho, D.H., and Park, H.J. (2015). IL-18 and Cutaneous Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 29357-29369. DOI: 10.3390/ijms161226172
- Leung, D.Y.M., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I., and Hamid, Q.A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation* 113, 651-657. DOI: 10.1172/JCI200421060
- Lin, X., He, S., and Xie, H. (2005). [Correlations between plasma levels of IL-18, IL-4, IFN-gamma, IgE and ECP in the patients with seasonal allergic rhinitis and their clinical implications]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 19, 195-7.
- Ling, P., Ngo, K., Nguyen, S., Thurmond, R.L., Edwards, J.P., Karlsson, L., and Fung-Leung, W. (2004). Histamine H4receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British Journal of Pharmacology* 142, 161-171. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705729
- McAleer, M.A., Jakasa, I., Hurault, G., Sarvari, P., McLean, W.H.I., Tanaka, R.J., Kezic, S., and Irvine, A.D. (2019). Systemic and stratum corneum biomarkers of severity in infant atopic dermatitis include markers of innate and T helper cell-related immunity and angiogenesis. *Br J Dermatol.* 180, 586-596. DOI: 10.1111/bjd.17088
- Mommert, S., Aslan, D., Ratz, L., Stark, H., Gutzmer, R., and Werfel, T. (2018a). The Anaphylatoxin C3a Receptor Expression on Human M2 Macrophages Is Down-Regulated by Stimulating the Histamine H4 Receptor and the IL-4 Receptor. *Journal of Innate Immunity* 10, 349-362. DOI: 10.1159/000490426
- Mommert, S., Gregor, K., Rossbach, K., Schaper, K., Witte, T., Gutzmer, R., and Werfel, T. (2018b). Histamine H2 receptor stimulation upregulates TH2 chemokine CCL17 production in human M2a macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 782-785.e5. DOI:10.1016/j.jaci.2017.06.023
- Mommert, S., Jahn, M., Schaper-Gerhardt, K., Gutzmer, R., and Werfel, T. (2021). Expression of histamine receptors H2R and H4R are predominantly regulated via the IL-4/IL-13 receptor type II on human M2 macrophages. *Allergy* 76, 2886. DOI: 10.1111/all.14979
- Murata, Y., Song, M., Kikuchi, H., Hisamichi, K., Xu, X.L., Greenspan, A., Kato, M., Chiou, C., Kato, T., Guzzo, C., Thurmond, R.L., Ohtsuki, M., and Furue, M. (2015). Phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, parallel-group study of a H4R-

- antagonist (JNJ-39758979) in Japanese adults with moderate atopic dermatitis. *J Dermatol* 42, 129-139. DOI: 10.1111/1346-8138.12726
- Nakanishi, K. (2018). Unique Action of Interleukin-18 on T Cells and Other Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 9, 763. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00763
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both TH1- and TH2 responses. *Annual Review of Immunology* 19, 423-474. DOI:10.1146/annurev.immunol.19.1.423
- Nakashima, C., Otsuka, A., and Kabashima, K. (2018). Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 27, 327. DOI: 10.1111/exd.13533
- Niranjan, R., Rajavelu, P., Ventateshaiah, S.U., Shukla, J.S., Zaidi, A., Mariswamy, S.J., Mattner, J., Fortgang, I., Kowalczyk, M., Balart, L., Shukla, A., and Mishra, A. (2015). Involvement of interleukin-18 in the pathogenesis of human eosinophilic esophagitis. *Clinical Immunology* 157, 103-113. DOI: 10.1016/j.clim.2015.01.007
- Nishikawa, K., Morii, T., Ako, H., Hamada, K., Saito, S., Narita, N., and Nuru, J. (1992). In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 90, 169-174. DOI:10.1016/0091-6749(92)90068-d
- Nold-Petry, C.A., Lo, C.Y., Rudloff, I., Elgass, K.D., Li, S., Gantier, M.P., Lotz-Havla, A.S., Gersting, S.W., Cho, S.X., Lao, J.C., Ellisdon, A.M., Rotter, B., Azam, T., Mangan, N.E., Rossello, F.J., Whisstock, J.C., Bufler, P., Garlanda, C., Mantovani, A., Dinarello, C.A., and Nold, M.F. (2015). IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nature Immunology* 16, 354-365. DOI: 10.1038/ni.3103
- Nutten, S. (2015). Atopic Dermatitis: Global Epidemiology and Risk Factors. *Annals of Nutrition and Metabolism* 66, 8-16. DOI: 10.1159/000370220
- O'Mahony, L., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2011). Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128, 1153-1162. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.06.051
- Ochiai, K., Otaka, K., Ito, M., and Tomioka, H. (2001). The Role of STAT1 in Activation of IL-3- and IL-5-Induced Eosinophils by Interferon Gamma. *International Archives of Allergy and Immunology* 124, 237-241. DOI: 10.1159/000053722
- Odhiambo, J.A., Williams, H.C., Clayton, T.O., Robertson, C.F., and Asher, M.I. (2009). Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, 1251-1258.e23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.10.009
- Ohsawa, Y., and Hirasawa, N. (2012). The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in NC/Nga mice. *Allergy* 67, 1014-1022. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02854.x
- Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., Tanimoto, T., Nukata, Y., Tanabe, F., Akita, K., Torigoe, K., Okura, T., Fukuda, S., and Kurimoto, M. (1995). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infection and Immunity* 63, 3966-3972. DOI: 10.1128/IAI.63.10.3966-3972.1995

- Palmer, C.N.A., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J.D., Fleckman, P., McElreavey, K., McLean, W.H.I., Sergeant, A., and Mukhopadhyay, S. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics* 38, 441-446. DOI: 10.1038/ng1767
- Panula, P., Chazot, P.L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W.L.S., Stark, H., Thurmond, R.L., and Haas, H.L. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacological Reviews* 67, 601-655. DOI: 10.1124/bp.114.010249
- Presland, R.B., and Dale, B.A. (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 11, 383-408. DOI: 10.1177/10454411000110040101
- Reher, T.M., Neumann, D., Buschauer, A., and Seifert, R. (2012). Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H4-receptor: Evidence for ligand-specific receptor conformations. *Biochem. Pharmacol.* 84, 192-203. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.04.004>
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., and O'Garra, A. (1997). IGIF Does Not Drive Th1 Development but Synergizes with IL-12 for Interferon-gamma Production and Activates IRAK and NFB. *Immunity* 7, 571-81. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80378-7
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., and Foster, P.S. (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews. Immunology* 13, 9-22. DOI: 10.1038/nri3341
- Rosbach, K., Nassenstein, C., Gschwandtner, M., Schnell, D., Sander, K., Seifert, R., Stark, H., Kietzmann, M., and Bäumer, W. (2011). Histamine H1 , H3 and H4 receptors are involved in pruritus. *Neuroscience* 190, 89-102. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.002
- Rosbach, K., Schaper, K., Kloth, C., Gutzmer, R., Werfel, T., Kietzmann, M., and Bäumer, W. (2016). Histamine H4 receptor knockout mice display reduced inflammation in a chronic model of atopic dermatitis. *Allergy* 71, 189-197. DOI: 10.1111/all.12779
- Roßbach, K., Wendorff, S., Sander, K., Stark, H., Gutzmer, R., Werfel, T., Kietzmann, M., and Bäumer, W. (2009). Histamine H4 receptor antagonism reduces hapten-induced scratching behaviour but not inflammation. *Experimental Dermatology* 18, 57-63. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00762.x
- Sanders, N.L., and Mishra, A. (2016). Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 32, 31-39. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.001
- Sareneva, T., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2000). IFN- α and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *The Journal of Immunology* 165, 1933-1938. DOI: 10.4049/jimmunol.165.4.1933
- Schaper-Gerhardt, K., Rosbach, K., Nikolouli, E., Werfel, T., Gutzmer, R., and Mommert, S. (2020a). The role of the histamine H 4 receptor in atopic dermatitis and psoriasis. *British Journal of Pharmacology* 177, 490-502. DOI: 10.1111/bph.14550
- Schaper, K., Rosbach, K., Köther, B., Stark, H., Kietzmann, M., Werfel, T., and Gutzmer, R. (2016). Stimulation of the histamine 4 receptor upregulates thymic stromal lymphopoietin

- (TSLP) in human and murine keratinocytes. *Pharmacological Research* 113, 209-215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.08.001>
- Schaper-Gerhardt, K., Köther, B., Wolff, L., Kabatas, A., Gehring, M., Nikolouili, E., Mommert, S., Werfel, T., and Gutzmer, R. (2020b). The H4 R is highly expressed on eosinophils from AD patients and IL-4 upregulates expression and function via the JAK/STAT pathway. *Allergy* 76, 1261-1264. DOI: 10.1111/all.14599
- Scheerer, C., and Eyerich, K. (2018). Pathogenese des atopischen Ekzems. *Hautarzt* 69, 191-196. DOI: 10.1007/s00105-018-4127-4
- Schirmer, B., Bringmann, L., Seifert, R., and Neumann, D. (2018). In vivo Evidence for Partial Activation of Eosinophils via the Histamine H4-Receptor: Adoptive Transfer Experiments Using Eosinophils From H4R^{-/-} and H4R^{+/+} Mice. *Frontiers in Immunology* 9, 2119. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02119
- Schmid-Grendelmeier, P., Simon, D., Simon, H., Akdis, C.A., and Wuthrich, B. (2001). Epidemiology, clinical features, and immunology of the intrinsic (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy* 56, 841-849. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2001.00144.x
- Schmitt, J., Schmitt, N.M., Kirch, W., and Meurer, M. (2009). Bedeutung des atopischen Ekzems in der ambulanten medizinischen Versorgung. *Hautarzt* 60, 320-327. DOI: 10.1007/s00105-009-1709-1
- Simon, D., Braathen, L.R., and Simon, H.-U. (2004). Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy* 59, 561-570. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2004.00476.x
- Simons, F.E., and Simons, K.J. (2011). Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128, 1139-1150.e4. DOI:10.1016/j.jaci.2011.09.005
- Sugimoto, T., Ishikawa, Y., Yoshimoto, T., Hayashi, N., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2004). Interleukin 18 acts on memory T helper cells type 1 to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naive host mouse. *The Journal of Experimental Medicine* 199, 535-545. DOI: 10.1084/jem.20031368
- Tai, P.-C., Sun, L., and Spry, C.J.F. (1991). Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro. *Clinical and Experimental Immunology* 85, 312-316. DOI: 10.1111/j.13652249.1991.tb05725.x
- Tanaka, T., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Wang, W., Higa, S., Koshimoto, T., Nakanishi, K., and Suemura, M. (2001). Interleukin-18 Is Elevated in the Sera from Patients with Atopic Dermatitis and from Atopic Dermatitis Model Mice, NC/Nga. *International Archives of Allergy and Immunology* 125, 236-240. DOI: 10.1159/000053821
- Taniuchi, S., Chihara, J., Kojima, T., Yamamoto, A., Sasai, M., and Kobayashi, Y. (2001). Serum eosinophil derived neurotoxin may reflect more strongly disease severity in childhood atopic dermatitis than eosinophil cationic protein. *Journal of Dermatological Science* 26, 79-82. DOI: 10.1016/S0923-1811(00)00151-1
- Terada, M., Tsutsui, H., Imai, Y., Yasuda, K., Mizutani, H., Yamanishi, K., Kubo, M., Matsui, K., Sano, H., and Nakanishi, K. (2006). Contribution of IL-18 to Atopic-Dermatitis-Like

- Skin Inflammation Induced by *Staphylococcus aureus* Product in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 103, 8816-8821. DOI: 10.1073/pnas.0602900103
- Thurmond, R.L. (2015). The histamine H4 receptor: from orphan to the clinic. *Frontiers in Pharmacology* 6, 65. DOI: 10.3389/fphar.2015.00065
- Thurmond, R.L., Kazerouni, K., Chaplan, S.R., and Greenspan, A.J. (2015). Antihistamines and Itch. *Handb Exp Pharmacol* 226, 257-290. DOI: 10.1007/978-3-662-44605-8_15
- Ueki, S., Melo, R.C., Ghiran, I., Spencer, L.A., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2013). Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* 121, 2074-83. DOI: 10.1182/blood-2012-05-432088
- Umehara, Y., Kiatsurayanon, C., Trujillo-Paez, J.V., Chieosilapatham, P., Peng, G., Yue, H., Nguyen, H.L.T., Song, P., Okumura, K., Ogawa, H., and Niyonsaba, F. (2021). Intractable Itch in Atopic Dermatitis: Causes and Treatments. *Biomedicines* 9, 229. DOI: 10.3390/biomedicines9030229
- Urasaki, T., Takasaki, J., Nagasawa, T., and Ninomiya, H. (2001). Pivotal role of 5-lipoxygenase in the activation of human eosinophils: platelet-activating factor and interleukin-5 induce CD69 on eosinophils through the 5-lipoxygenase pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 105-112. DOI: 10.1189/jlb.69.1.105
- Vakharia, P.P., and Silverberg, J.I. (2019). Adult-Onset Atopic Dermatitis: Characteristics and Management. *Am J Clin Dermatol* 20, 771-779. DOI: 10.1007/s40257-019-00453-7
- Venkateshaiah, S.U., Mishra, A., Manohar, M., Verma, A.K., Rajavelu, P., Niranjan, R., Wild, L.G., Parada, N.A., Blecker, U., Lasky, J.A., and Mishra, A. (2018). A critical role for IL-18 in transformation and maturation of naive eosinophils to pathogenic eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142, 301-305. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.02.011
- Verhaeghe, B., Gevaert, P., Holtappels, G., Lukat, K.F., Lange, B., Van Cauwenberge, P., and Bachert, C. (2002). Up-regulation of IL-18 in allergic rhinitis. *Allergy* 57, 825-830. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2002.23539.x
- Verma, A.K., Kandikattu, H.K., Manohar, M., Shukla, A., Upparahalli Venkateshaiah, S., Zhu, X., and Mishra, A. (2019). Intestinal overexpression of IL-18 promotes eosinophils-mediated allergic disorders. *Immunology* 157, 110-121. DOI: 10.1111/imm.13051
- Wang, H., Shen, H., Lee, J.J., and Lee, N.A. (2006). CD69 expression on airway eosinophils and airway inflammation in a murine model of asthma. *Chinese Medical Journal* 119, 1983-90.
- Wang, Z., Liu, Z., Wang, L., Wang, J., Chen, L.L., Xie, H., Zhang, H., and He, S. (2018). Altered expression of IL-18 binding protein and IL-18 receptor in basophils and mast cells of asthma patients. *Scand J Immunol* 87, e12658. DOI: 10.1111/sji.12658
- Werfel, T., Allam, J.-P., Biedermann, T., Eyerich, K., Gilles, S., Guttman-Yassky, E., Hoetzenecker, W., Knol, E., Simon, H.-U., Wollenberg, A., Bieber, T., Lauener, R., Schmid-Grendelmeier, P., Traidl-Hoffmann, C., and Akdis, C. (2016a). Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138, 336-349. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.06.010
- Werfel, T. (2009). The Role of Leukocytes, Keratinocytes, and Allergen-Specific IgE in the Development of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 1878-1891. DOI: 10.1038/jid.2009.71

- Werfel, T., Heratizadeh, A., Aberer, W., Ahrens, F., Augustin, M., Biedermann, T., Diepgen, T., Fölster-Holst, R., Gieler, U., Kahle, J., Kapp, A., Nast, A., Nemat, K., Ott, H., Przybilla, B., Roecken, M., Schlaeger, M., Schmid-Grendelmeier, P., Schmitt, J., Schwennesen, T., Staab, D., and Worm, M. (2016b). S2k guideline on diagnosis and treatment of atopic dermatitis - short version. *Dtsch Dermatol Ges.* *14*, 92-105. DOI: 10.1111/ddg.12871
- Werfel, T., Layton, G., Yeadon, M., Whitlock, L., Osterloh, I., Jimenez, P., Liu, W., Lynch, V., Asher, A., Tsianakas, A., and Purkins, L. (2018). Efficacy and safety of the histamine H 4 receptor antagonist ZPL-3893787 in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *143*, 830-1837.e4. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.07.047
- Werfel, T., Schwerk, N., Hansen, G., and Kapp, A. (2014). The Diagnosis and Graded Therapy of Atopic Dermatitis. *Dtsch Arztebl* *111*, 509-520. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0509
- Wittmann, M., Purwar, R., Hartmann, C., Gutzmer, R., and Werfel, T. (2005). Human Keratinocytes Respond to Interleukin-18: Implication for the Course of Chronic Inflammatory Skin Diseases. *Journal of Investigative Dermatology* *124*, 1225-1233. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23715.x
- Yamaguchi, T., Kimura, H., Kurabayashi, M., Kozawa, K., and Kato, M. (2008). Interferon- γ enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunology Letters* *118*, 88-95. DOI: 10.1016/j.imlet.2008.03.005
- Yasuda, K., Nakanishi, K., and Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* *20*, 649. DOI: 10.3390/ijms20030649
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., and Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production. *The Journal of Immunology* *161*, 3400-3407.
- Yoshimoto, T., Mizutani, H., Tsutsui, H., Noben-Trauth, N., Yamanaka, K., Tanaka, M., Izumi, S., Okamura, H., Paul, W.E., and Nakanishi, K. (2000). IL-18 induction of IgE: dependence on CD4 + T cells, IL-4 and STAT6. *Nature Immunology* *1*, 132-137. DOI: 10.1038/77811
- Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Tominaga, K., Hoshino, K., Okamura, H., Akira, S., Paul, W.E., and Nakanishi, K. (1999). IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *96*, 13962-13966. DOI: 10.1073/pnas.96.24.13962
- Ziegler, S.V., Ramsdell, F., and Alderson, M.R. (1994). The activation antigen CD69. *Stem Cells* *12*, 456-465. DOI: 10.1002/stem.5530120502

7 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Immunologische Vorgänge im Entzündungsgeschehen der AD	3
Abbildung 2: Rolle des H ₄ R auf für die AD relevanten Zellen	6
Abbildung 3: Eosinophileninfiltrat in läsionaler Haut von einem AD-Patienten	8
Abbildung 4: Pleiotrope Funktionen von IL-18	10
Abbildung 5: Studiendesign	20
Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation	20
Abbildung 7: Zählkammer nach Neubauer zur quantitativen Bestimmung von Leukozyten	21
Abbildung 8: Magnetische Trennung der Eosinophilen von den Neutrophilen	22
Abbildung 9: Schematische Amplifikationskurve einer quantitativen Real-time PCR	26
Abbildung 10: Programmablauf der RT-PCR im LightCycler® 480	27
Abbildung 11: Histogramm und Punktdiagramm	28
Abbildung 12: Prinzip des direkten Sandwich ELISA	29
Abbildung 13: Histamin induziert die Hochregulation der IL-18 mRNA Expression über den H ₄ R und H ₂ R in AD-Patienten	32
Abbildung 14: IL-18 mRNA Induktion durch Histamin korreliert im Trend mit Anteil an Eosinophilen im Blut und SCORAD	33
Abbildung 15: Unveränderte IL-37 mRNA Expression in Histamin-stimulierten Eosinophilen von AD-Patienten	34
Abbildung 16: Histamin induziert die Hochregulation der IL-18R α mRNA Expression über den H ₄ R und H ₂ R in AD-Patienten	35
Abbildung 17: Gating Strategie IL-18R α	36
Abbildung 18: Effekt von Histamin, ST-1006 und Amthamin auf IL-18R α Expression	37
Abbildung 19: Histamin vermittelt Hochregulation der IL-18R α Expression über den H ₂ R auf Proteinebene	38
Abbildung 20: Die IL-18R α Induktion durch Histamin korreliert signifikant mit Anteil an Eosinophilen im Blut	39

Abbildung 21: Effekt von IFN- γ und Histamin + IFN- γ auf IL-18R α Expression.....	40
Abbildung 22: Histamin potentiert die IFN- γ -vermittelte Hochregulation der IL-18R α Expression über den H ₂ R	41
Abbildung 23: Effekt von IL-5 und Histamin + IL-5 auf die IL-18R α Expression.....	42
Abbildung 24: Histamin hebt die IL-5-vermittelte Herunterregulation der IL-18R α Expression über den H ₄ R auf	43
Abbildung 25: IL-18 steigert die ECP und EDN mRNA Expression über IL-18R α	45
Abbildung 26: Gating Strategie CD69.....	47
Abbildung 27: Effekt von IL-5 und Histamin + IL-5 auf die CD69 Protein Expression	48
Abbildung 28: Histamin verstärkt die IL-5-vermittelte Hochregulation der CD69 Protein Expression über den H ₄ R in AD-Patienten	49
Abbildung 29: Effekt von IFN- γ und Histamin + IFN- γ auf die CD69 Protein Expression.....	50
Abbildung 30: Histamin verstärkt die IFN- γ -vermittelte Hochregulation von CD69 Protein Expression in AD-Patienten	51
Abbildung 31: Leichte Steigerung der CD69 Protein Expression durch Kombination von Histamin mit IL-4 oder IL-13.....	52
Abbildung 32: Kein Einfluss von IL-18 auf die IL-18R α Expression.....	78
Abbildung 33: Kein Einfluss von IL-18 auf CD274 (PD-L1) Expression	79

8 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Stimulanzen und untersuchte Zielstrukturen	23
Tabelle 2: Zusammensetzung der Mastermixe zum Umschreiben von RNA zu cDNA	24
Tabelle 3: Zusammensetzung eines PCR-Mastermixes.....	26

Eidesstattliche Erklärung

nach § 2 Abs. 2 Nrn. 7 und 8 Promotionsordnung der
Medizinischen Hochschule Hannover

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte
Dissertation mit dem Titel

**„Der Einfluss von Histamin, dem H₄-Rezeptor und dem H₂-Rezeptor auf die
Regulation und Expression von IL-18 und dem IL-18 Rezeptor
auf humanen eosinophilen Granulozyten“**

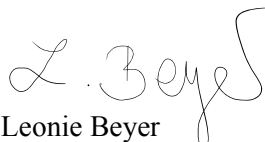
in der Forschungsabteilung für Immundermatologie und experimentelle Allergologie unter der
Betreuung von Prof. Dr. med. Thomas Werfel und Dr. med. vet. Katrin Schaper-Gerhardt ohne
sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort
aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren
ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation
eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von
Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für
mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder
ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den
beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Originalbeitrag

Beyer, L., Kabatas, A.S., Mommert, S., Stark, H., Werfel, T., Gutzmer, R., and Schaper-Gerhardt,
K. (2022). Histamine Activates Human Eosinophils via H₂R and H₄R Predominantly in Atopic
Dermatitis Patients. *Ijms* 23, 10294. DOI: 10.3390/ijms231810294

Hannover, den



Leonie Beyer

Anhang

Anhang 1:

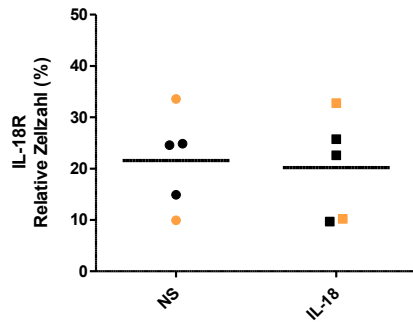
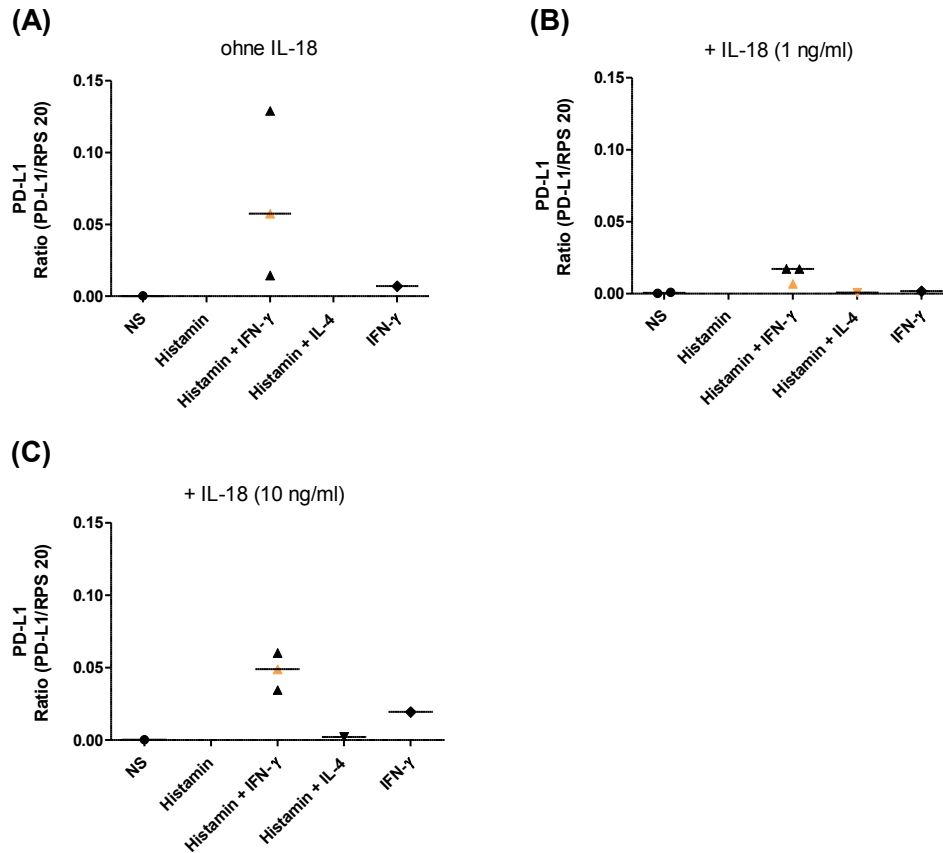


Abbildung 32: Kein Einfluss von IL-18 auf die IL-18R α Expression

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz, n = 3) und gesunden Probanden (orange, n = 2) wurden mit IL-18 für 20 h stimuliert. Die IL-18R α Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im Median dargestellt.

Anhang 2:**Abbildung 33: Kein Einfluss von IL-18 auf CD274 (PD-L1) Expression**

Eosinophile Granulozyten von AD-Patienten (schwarz) und gesunden Probanden (orange) wurden im Dreifach-Ansatz in Histamin (10 $\mu\text{mol/l}$), IFN- γ (10 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml) sowie der Kombination der beiden Zytokine mit Histamin in den angegebenen Konzentrationen für 18 h präinkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und in neues Nährmedium (RPMI Complete) überführt. Zwei der Ansätze wurden dann mit IL-18 in den Konzentrationen 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml für weitere 6 h inkubiert, während der letzte Ansatz nicht-stimuliert blieb. Die gemessene CD274 (syn. PD-L1) Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt und ist im Median dargestellt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich dafür bedanken, in dieser wunderbaren Abteilung die Möglichkeit zur medizinischen Promotion bekommen zu haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med Thomas Werfel** für die Überlassung des Projektes und seine allseits kompetente Betreuung. Die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung, das Teamgefühl und die guten Arbeitsbedingungen haben meine Zeit als Promotionsstudentin sehr positiv geprägt.

Ebenso bedanke ich mich in besonderem Maße bei meiner Betreuerin **Frau Dr. med. vet. Katrin Schaper-Gerhardt**, die jederzeit als Ansprechpartnerin erreichbar war und mir bei der Umsetzung der gesamten Arbeit sehr engagiert und zuverlässig zur Seite stand. Ein wesentlicher Faktor für das Gelingen dieses Projekts war ihre enge Betreuung, wofür ich sehr dankbar bin.

Auch **Herrn Prof. Dr. med. Ralf Gutzmer** spreche ich für das Begleiten meiner Arbeit und das Einbringen seiner fachlichen Kompetenz meinen ausdrücklichen Dank aus. In regelmäßigen Laborbesprechungen brachten seine Ideen das Projekt richtungsweisend voran. Der freundliche Umgang miteinander wird mir positiv in Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Detlef Neumann danke ich für die Annahme der Co-Betreuung im Rahmen der Strukturierten Doktorandenausbildung StrucMed und für seine konstruktiven Ideen für das erfolgreiche Voranschreiten meines Projektes.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Gitta** und **Ela**, meinen kleinen Heldinnen im Labor, sowie **dem ganzen Laborteam**. Ich hätte mir kein besseres Kollegium erträumen können! Eure Hilfsbereitschaft und Geduld für meine Fragen und Probleme waren wirklich einmalig.

Ebenfalls danke ich **Christina, Pia, Julia** und **Petra** aus dem Routine-Labor für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Bedienung der Laborgeräte.

Weiterhin danke ich den Studienärzten **Dr. Stephan Traidl**, **Dr. Sina Freimooser** und **Sara Rawecki** für die Zusammenarbeit in der Rekrutierung von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) für mein Projekt. Letzteres wurde erst durch die Teilnahme von AD-Patienten und gesunden Probanden ermöglicht, wofür ich allen Beteiligten meinen Dank ausspreche.

Ganz besonders dankbar bin ich für die tolle Zusammenarbeit unter uns **Doktoranden**, Nina, Leo, Sanjay, Sophie, Patricia, Cornelia, Mike, Shruti und Kristin! Das gegenseitige Unterstützen bei Höhen und bei Tiefen sowie der tägliche Austausch hat uns fest zusammengeschweißt. Allen voran danke ich meiner Mitstreiterin **Nina**, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tatkraft beiseite stand und mein Projekt so gut kennt, als wäre es ihr eigenes.

Zu guter Letzt danke ich meiner lieben **Familie**, insbesondere meinen **Eltern Birgit und Thorsten**, meinem **Bruder Yannic und Farina** und meinem **Freund Sören** für all die Unterstützung und das schöne Gefühl, dass alle so stolz auf mich sind.