

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Mäuse mit humanisiertem Immunsystem als Modell für Atopische Dermatitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Thomas Nolte

aus Paderborn

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 17. Mai 2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Atopische Dermatitis	2
2.1.1 Definition	2
2.1.2 Epidemiologie	2
2.2 Ätiologie	3
2.2.1 Inside-Outside	4
2.2.2 Outside-Inside	5
2.2.3 Das Zytokin-Profil von AD	7
2.2.4 IL-4/IL-13 vermittelte Signalkaskade	7
2.2.5 Die Rolle von IgE bei Atopischer Dermatitis	8
2.3 Klinik der Atopischen Dermatitis	10
2.3.1 Symptome	10
2.3.2 Diagnose	11
2.3.3 Therapie	13
2.4 Tiermodelle Atopische Dermatitis	16
2.4.1 Spontane Entwicklung von Atopischer Dermatitis	16
2.4.2 Transgene Mäuse mit Über- oder Unterexpressionen	16
2.4.3 Chemisch- oder allergen-induzierte Modelle	17
2.5 Mäuse mit humanem Immunsystem	18
2.5.1 Nod-scid IL2 R γ -chain ^{null}	19
2.5.2 Rekonstitution	20
3 Publikation	22

4 Diskussion	33
4.1 Die Rolle des Spenders	34
4.2 Unterschiede zu Untersuchungen mit immunkompetenten Mäusen	35
4.2.1 Die Stimulierung durch Ethanol	35
4.2.2 Erhöhte Variabilität	35
4.2.3 Stimmulierung mit hIL-4	36
5 Zusammenfassung	38
6 Summary	40
Literaturverzeichnis	41
Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
AMP	antimikrobielle Proteine
APC	Antigen-präsentierende Zellen
DC	Dendritische Zellen
ETFAD	European Task Force on Atopic Dermatitis
FACS	fluorescenc activated cell sorting
Fillagrin	filament-associated protein
FLG	filament-aggregation protein Gen
GVHD	Graft-versus-Host-Disease (Transplantat-Wirt-Reaktion)
hIgE	humanes IgE
hIgG	humanes IgG
hIL-4	humanes Interleukin-4
HSC	haematopoietic stem cells
IFN-γ	Interferon- γ
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IL2rg	Interleukinrezeptor-2 γ -chain
IL-4Rα	Interleukin-4 Rezeptor α
IL-13Rα1	Interleukin-13 Rezeptor α 1
LEKTI	lymphoepithelial Kazal-type trypsin inhibitor
MHC	major histocompatibility complex
NK-Zellen	Natural Killer Cells
Nod	non-obese diabetic
Nod/scid	NOD.CB17-Prkdc ^{scid}
Nod-scid IL2	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tmWjl} /Sz
Rγ-chain^{null}	
PBMC	periphal-blood mononuclear cells

PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
PGE_1	Prostaglandin E_1
SC	Stratum Corneum
scid	protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptid, severe combined immunodeficiency
SCORAD	SCORing AD
SP	Serin-Proteasen
SPF	specific pathogen free
TEWL	transepidermal water loss
TH2-Zellen	T-Helferzellen Typ 2
TIS	three-item severity score
TNCB	2,4,6-Trinitro-1-chlorobenzene
UC	Colitis ulcerosa

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat sich immer mehr gezeigt, dass Tiermodelle in vielen Bereichen der medizinischen Forschung wertvolle Erkenntnisse liefern können. Es ist unbestritten, dass sie einen großen Anteil am Erkenntnisgewinn der letzten Jahrzehnte haben. Ergebnisse, die in Tiermodellen gewonnen wurden, sind jedoch nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Unterschiede in der Physiologie zwischen Mensch und Tier, wie zum Beispiel unterschiedliche Rezeptorstrukturen und Signalkaskaden, schränken dies ein. Die Auswahl unter den zur Verfügung stehenden Modellen sollte aus diesem Grund sorgfältig getroffen werden.

Mausmodelle mit humanisiertem Immunsystem bieten den großen Vorteil, dass die rekonstituierten PBMC das humane therapeutische Zielmolekül besitzen, und man auf diese Weise Versuche in nicht-menschlichen Primaten oder die Entwicklung von Surrogatmolekülen vermeiden kann. Darüber hinaus spiegeln diese Zellen den immunologischen Hintergrund der Spender wider. Die beschränkte Lebensdauer dieser Mäuse macht es jedoch schwierig, solche Tiermodelle für chronische Erkrankungen zu entwickeln.

Ziel der Doktorarbeit war es zu zeigen, dass auch in Mäusen mit humanisiertem Immunsystem ein Modell einer chronischen Erkrankung etabliert werden kann.

2 Literaturübersicht

2.1 Atopische Dermatitis

2.1.1 Definition

Atopische Dermatitis gehört zu einer Gruppe von chronisch rezidivierenden entzündlichen Erkrankungen, unter denen immer mehr Menschen in Industrieländern leiden.

AD ist eine nicht ansteckende chronische oder chronisch rezidivierende Hauterkrankung. Synonym verwendet werden unter anderem Neurodermitis constituionalis sicca atopica, atopisches Ekzem und endogenes Ekzem.

Es werden zwei Formen unterschieden. Die extrinsische Form, die auf 80% der Fälle zutrifft, ist durch IgE vermittelte Reaktionen gegen Antigen gekennzeichnet (BARNETSON et al., 1989). Bei der intrinsischen Form kann im Gegensatz dazu kein erhöhter IgE-Spiegel nachgewiesen werden. Die intrinsische Form entwickelt sich im Laufe der Erkrankung zur extrinsischen (NOVAK et al., 2004).

2.1.2 Epidemiologie

Atopische Dermatitis ist eine chronische Hauterkrankung, die aufgrund ihrer hohen Prävalenz einen der wichtigsten Forschungsschwerpunkte der Dermatologie darstellt. Sie ist eine der am häufigsten auftretenden entzündlichen Hauterkrankungen,

unter der 10–20% aller Kinder sowie 1–3% aller Erwachsenen in der industrialisierten Welt leiden. Die Prävalenz hat in den letzten Jahren weiter zugenommen (NIEBUHR und WERFEL, 2010; BOGUNIEWICZ und LEUNG, 2006; CORK et al., 2006). Meist beginnt die Erkrankung bereits im Säuglingsalter. Innerhalb der ersten sechs Monate des Lebens erkranken 45%, innerhalb des ersten Jahres 60% der Patienten. Bei 85% treten erste Symptome bis zum fünften Lebensjahr auf (ZHENG et al., 2011; KAY et al., 1994). Nur etwas mehr als die Hälfte (60%) der jung erkrankten Patienten werden gesund. Bei den übrigen wird AD zu einer lebenslangen Krankheit (KAY et al., 1994; SPERGEL und PALLER, 2003; SPERGEL, 2005, 2010). Patienten mit AD tragen ein erhöhtes Risiko auch an Allergien und im Laufe der Erkrankung an Asthma zu erkranken. In der Normalbevölkerung beträgt das Risiko an Asthma zu erkranken 4–8%. Menschen mit einer starken Ausprägung von AD entwickeln hingegen in 70% der Fälle Asthma (SPERGEL und PALLER, 2003). Dies ist in der Literatur unter dem Begriff „atopic march“ (Atopischer Marsch) bekannt (ZHENG et al., 2011).

2.2 Ätiologie

Wie auch bei anderen multifaktoriellen Erkrankungen ist die Ätiologie von AD nicht geklärt. Es wurden zur Aufklärung der Ursachen verschiedene Aspekte beleuchtet, deren Zusammenspiel noch im Detail geklärt werden muss. Zwei wesentliche Faktoren scheinen in der Ätiologie von Atopischer Dermatitis eine Rolle zu spielen: Schädigung der Epidermis und eine Dysregulation des Immunsystems.

Die Epidermis ist ein primär mit der Umwelt in Kontakt tretendes Gewebe. Sie bildet eine Barriere zur Umwelt, gegen mechanische, toxische oder physikalische Noxen von außen, schützt aber auch den Körper vor Wasserverlust. Diese Funktionen sind bei Patienten der Atopischen Dermatitis gestört (ELIAS et al., 2008; ELIAS und STEINHOFF, 2008; BOGUNIEWICZ und LEUNG, 2011; CORK et al., 2006). Ob die Schädigung der Epidermis durch genetische Veränderungen zu einer Dysregulation des Immunsystems führt, oder ob die Dysregulation die Schädigung der Epidermis bedingt, bedarf der Klärung. Die beiden Hypothesen sind unter den Begriffen

„Inside-out“ und „Outside-in“ bekannt. In den letzten Jahren gab es vermehrt Anstrengungen Genveränderungen, die AD begünstigen, aufzuspüren.

2.2.1 Inside-Outside

Immunologische Trigger

Die Inside-Outside-Theorie wird durch die Beobachtung, dass immunologische Trigger, die Allergien auslösen, auch AD hervorrufen können, gestützt. Bei bis zu 40% der Kinder mit moderater bis schwerer AD erzeugen Nahrungsallergene Hautveränderungen (LEUNG und BIEBER, 2003). Dies konnte auch in einem Mausmodell, in dem durch orale Antigengabe AD-Symptome entwickelt werden können, gezeigt werden. T-Helferzellen, die Nahrungsallergene erkennen, konnten in der Haut isoliert werden (OYOSHI et al., 2011). Allergene, Hausstaub, Tierhaare, Pollen, u.a., die über die Atemwege mit dem Körper in Kontakt treten, haben das Potenzial, Läsionen zu erzeugen. 30–50% der AD-Patienten reagieren positiv auf einen Pricktest in unveränderten Hautbereichen mit typischen Allergenen für respiratorische Allergien (RING et al., 1997, 2001).

Autoantigene

Die Relevanz der IgE vermittelten Autoimmunität gegenüber humanen Proteinen ist nicht geklärt. 80% der Kinder, aber nur 25% der erwachsenen AD-Patienten zeigen eine immunologische Reaktion gegenüber körpereigenen Proteinen (MOTHES et al., 2005). Die fälschlich als körperfremd erkannten Proteine, meist aus dem Inneren von Zellen, weisen eine hohe Homologie zu Bakterienantigenen auf (VALENTA et al., 1996; NOMURA et al., 2007). Durch die AD-Symptome und zusätzliches Kratzen der Haut werden die Proteine freigesetzt. Die Autoallergenspiegel gehen bei erfolgreicher Behandlung zurück (KINACIYAN et al., 2002).

Vermehrte bakterielle Besiedelung

Die Haut erfüllt bei gesunden Menschen nicht nur durch die Barriere, sondern auch durch antimikrobielle Proteine (AMP) eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Infektionen. Auch diese Funktion der Haut ist bei AD-Patienten gestört, was durch den vermehrten Nachweis von Bakterien direkt bewiesen werden kann. Die vielleicht am besten beschriebene Besiedelung von AD-Patienten ist die mit

Staphylococcus aureus. Nahezu 90% aller Patienten sind mit *S. aureus* besiedelt. Dabei sind 50–60% der nachgewiesenen Stämme Toxin produzierend. In Kontrollgruppen sind *Staphylococcus aureus* nur in 5–30% der Probanden anzutreffen (MATSUI et al., 2000). *S. aureus* kann über verschiedene Mechanismen AD in ihrer Ausprägung beeinflussen. Beispielsweise können die Toxine als Superantigen auf T-Zellen wirken und somit IgE spezifische Antworten auslösen (MCGIRT und BECK, 2006; ONG et al., 2002). Es sind Superinfektionen mit bis zu 10^7 Organismen pro cm^2 beobachtet worden (MATSUI et al., 2000). AMPs sind in der Haut von AD-Patienten in ihrer Expression gestört. Trotz der erhöhten Besiedelung mit Bakterien sind die angetroffenen Level in der Haut von AD-Patienten nicht von denen in normaler Haut zu unterscheiden. Die Expression ist nicht, wie zu erwarten, erhöht. Dies ist kein primärer Effekt, sondern wird durch die vermehrte Anwesenheit von typischerweise durch TH2-Zellen sezernierten Zytokine IL-4 und IL-13 und des immunmodulierenden Zytokin IL-10 bedingt, die einen inhibitorischen Effekt auf AMPs haben (ONG et al., 2002; HOWELL et al., 2005; WOLF und WOLF, 2012).

2.2.2 Outside-Inside

Genetik

Das Zusammenspiel vieler Faktoren führt zur Manifestation von AD. Die genetischen Faktoren untermauern die Outside-Inside-Hypothese. Bei vielen Betroffenen kann eine Häufung innerhalb der Familie, mit einem starken maternalen Einfluss, festgestellt werden (LEUNG und BIEBER, 2003). Dies lässt einen starken genetischen Einfluss vermuten. Mutationen im filament-aggregation protein Gen (*FLG*), 2282del14 und R501X (PALMER et al., 2006), bedeuten ein höheres Risiko als jedes andere identifizierte Risikogen. Dieses Gen ist verantwortlich für die Bildung von Filaggrin (filament-associated protein). Filaggrin ist entscheidend an der Ausbildung einer gesunden Hautbarriere beteiligt (SANDILANDS et al., 2009). Es kann eine starke Assoziation zwischen *FLG* Defekten und durch Dermatologen diagnostizierte Fälle von AD beobachtet werden. Weiterhin wird diskutiert, dass der *FLG* Defekt Asthma – vermittelt durch transkutane Sensitivierung – ermöglicht. Filaggrin wird nicht in bronchialer Mukosa exprimiert (WOLF und WOLF, 2012; VAN DEN OORD und SHEIKH, 2009; RODRIGUEZ et al., 2009). Einen deutlich geringeren Effekt haben Veränderungen in der Aktivität von Serin-Proteasen (SP).

SP beeinflusst stark die Formation und Funktion der Hautbarriere. Erhöhte SP-Aktivität kann allein zu einer Reduzierung von Hautlipiden und AD typischen Ceramid Leveln führen. Inhibition von SP-Aktivität durch topische Applikation von Inhibitoren verbessert die Erholung der Haut (HACHEM et al., 2006). Beweise für die genetische Prädisposition dieser Veränderungen konnten durch die Homologien zum Netherton Syndrom – unter anderem zeigen diese Patienten moderate AD – aufgedeckt werden. Das Netherton Syndrom entsteht durch Mutationen im *SPINK5* Gen. Dieses ist kodierend für *LEKTI* (lymphoepithelial Kazal-type trypsin inhibitor). *LEKTI* ist der direkte Gegenspieler von SP (SPRECHER et al., 2001; WOLF und WOLF, 2012).

Gestörte Hautbarriere

Lipide spielen in der Haut eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barriere. Ceramide bilden zusammen mit Strukturproteinen in der Keratinocytschicht Komplexe. Diese sind die wichtigsten Wasser zurückhaltenden Moleküle in dieser Hautschicht (NOVAK und BIEBER, 2000; MURATA et al., 1996). Bei Patienten mit AD ist der TEWL nicht nur in entzündeten Bereichen, sondern auch in nicht betroffenen Hautarealen erhöht (GFESSER et al., 1996). Zusätzlich schädigt das Kratzen der Haut, das durch den starken Juckreiz ausgelöst wird, die Haut. Der Kreislauf aus Hautentzündungen, Juckreiz und Kratzen verstärkt und erhält sich gegenseitig.

ω -6 Fettsäuren

Die gestörte Umwandlung von ω -6 Fettsäuren zu Prostaglandin E_1 (PGE_1) wird mit AD in Verbindung gebracht. Diese sind unter anderem im Thymus an der T-Zell-Reifung und an der Hormonproduktion beteiligt. Dies ist eine Verbindung zu der Zell vermittelten und humoralen Immunreaktion bei AD (NOVAK et al., 2003).

Bisher konnte sich weder die Inside-Outside-Hypothese, noch die Outside-Inside-Hypothese durchsetzen. Vermutlich ist es ein Zusammenspiel von beiden Mechanismen, das zum Ausbruch der AD führt. Aspekte beider Hypothesen ergänzen und verstärken sich.

und der Tyrosinkinase 2 (TYK2) zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6) (GEHA et al., 2003). Die Proliferation von T-Zellen und die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu TH2-Zellen scheint vom Rezeptorkomplex Typ I, die phänotypischen Ausprägungen (IgM/IgE Switch, Fibrose, Hyperplasie, Mukusproduktion und Chemokinproduktion) vom Typ II gesteuert zu sein. Der zweite Rezeptor-Typ kann auch durch IL-13 aktiviert werden. Zu den phänotypischen pathologischen Merkmalen der AD, die durch IL-4 und IL-13 verursacht werden, gehören IgM/IgE switch, Fibrose und epitheliale Hyperplasie.

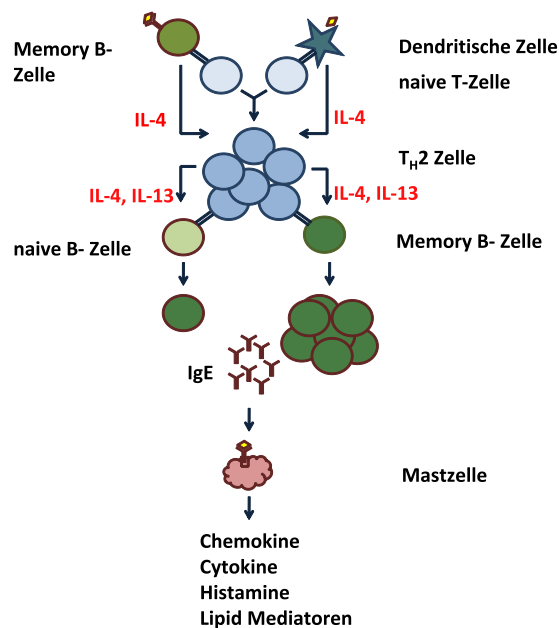


Abbildung 2.2 Sensitivierung, Induktion von Memory B-Zellen und Mastzellaktivierung

2.2.5 Die Rolle von IgE bei Atopischer Dermatitis

Vier Fünftel (80%) der AD-Patienten haben einen erhöhten IgE-Serumspiegel, der als wichtiges Merkmal der extrinsischen Form der AD angesehen wird. IgE ist bei den allergischen Reaktionen vom Typ I (Soforttyp) und Typ IV (verzögerter Typ) beteiligt. Bei den allergischen Reaktionen des Soforttyp (Allergie Typ I) kommt es nach einem Erstkontakt mit dem Allergen und einer Desensibilisierung zur IgE-Antikörper-Produktion durch Plasmazellen. Die Mastzellen und Basophilen

erkennen den Allergen-Antikörper-Komplex und binden diesen. Dies führt innerhalb weniger Minuten zur Zerstörung der Zellen und einem Einstrom von Entzündungszellen (DESCOTES und CHOQUET-KASTYLEVSKY, 2001). Die verzögerte Reaktion des Allergie Typ IV wird bei AD zu großen Teilen durch TH2 Zellen vermittelt (LEUNG, 1995). Die Interleukine 4, 5 und 13 sind hier entscheidend (HAMID et al., 1994; LEUNG, 1999). IL-4, -5 und -13 verschieben die Balance von der TH1 gesteuerten Inflammation zugunsten der TH2-Zell dominierten AD. Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass IL-4 und IL-10 die Produktion der typischen Zytokine der TH1-Zellen, z.B. IFN- γ reduzieren und die Entwicklung von TH2-Zell Klonen verstärken (CHAN et al., 1993; LESTER et al., 1995). Da umgekehrt IFN- γ die Synthese von IgE und IL-4 produzierenden TH2-Zellen unterdrückt, verstärkt die reduzierte Expression des IFN- γ die Entwicklung von TH0-Zellen zu TH2-Zellen (JUJO et al., 1992; GAJEWSKI et al., 1989).

IgE spielt bei der „Aufrechterhaltung“ des Entzündungsprozesses eine wichtige Rolle. Es ist für einige typische Veränderungen verantwortlich. Diese sind vermehrter Einstrom von Eosinophilen, erhöhte Expression von Cytokinen und veränderte Rezeptorausstattung dendritischer Zellen in Läsionen im Vergleich zu Läsionen von nicht AD-Patienten (WERFEL, 2009). Spezifisches IgE spielt des Weiteren eine Rolle bei der Aktivierung von Mastzellen und DC über spezifische Rezeptoren (BIEBER, 2007). Kratzen führt, durch IgE vermittelt, in kutanen Mastzellen zu Histaminfreisetzung. Histaminrezeptoren auf T-Zellen, APC und Keratinocyten können aktiviert werden und die Entzündung verstärken (JUTEL et al., 2001; GUTZMER et al., 2005; GIUSTIZIERI et al., 2004). Durch die Ähnlichkeiten in der Pathophysiologie der Erkrankungen bieten sich Möglichkeiten, gleiche Therapieansätze für alle drei Erkrankungen – Asthma, AD und UC – zu nutzen (EICHENFIELD et al., 2003).

2.3 Klinik der Atopischen Dermatitis

2.3.1 Symptome

Die Ausprägung der AD ist abhängig von Chronizität und Alter. Es treten keine einheitlichen Symptome auf. Phasen geringer Intensität werden von Phasen mit starken Symptomen unterbrochen. Vermutlich ist das Hauptsymptom starker Juckreiz. Dieser tritt in allen Altersgruppen auf und bedingt durch das Kratzen weitere Veränderungen in der Haut (BRAUN-FALCO, 1996; LEUNG und SOTER, 2001).

Bei Kleinstkindern sind meist das Gesicht, der Kopf und/oder eher selten die Streckseiten der Extremitäten betroffen. An diesen Stellen bilden sich zunächst Bläschen. Anschließend trocknet das Wundsekret ein und bildet mit den Schuppen Verkrustungen; dieses bräunlich milchige Gemenge ist als Milchschorf bekannt, erstmals beschrieben von Wichmann 1794. Während dieser Lebensperiode dominiert das exudativ-entzündliche Bild.

Mit zunehmendem Alter, ab dem zweiten bis dritten Lebensjahr, verschiebt sich die Lokalisation der betroffenen Areale. Ab diesem Zeitpunkt sind vermehrt die Beugen der großen Gelenke, der Schultergürtel und der obere Brustbereich, weiterhin das Gesicht und der Nacken sowie Hand- und Fußrücken betroffen. Das durch starken Juckreiz ausgelöste Kratzen gilt als weiterer Trigger für AD. Leitsymptome in dieser Phase sind papulöse Veränderungen mit beginnender Lichenifikation und sehr trockene Haut (LEUNG und SOTER, 2001; NICKOLOFF und NAIDU, 1994).

Jugendliche (ab ca. zwölf Jahren) und adulte Patienten zeigen ausgedehnte Prurigo papeln, Lichenifikation, trockene Haut, Schuppen, entzündliche Rötungen und verdickte Haut. In dieser Altersgruppe treten vermehrt eher lokalisierte Formen und Minimalbilder auf (Ohrläppchenrhagaden, Pulpitis sicca, isolierte Ekzeme an Händen, Handrücken, u.a.). Außerdem kann eine Reihe von assoziierten Begleiterscheinungen wie Keratosis pilaris, Ichthyosis vulgaris, periorale Blässe, Dennie-Morgan-Falte, u.a. auftreten (LEUNG und BIEBER, 2003).

2.3.2 Diagnose

AD wird ausschließlich über Anamnese und klinische Befunde diagnostiziert. Im Jahr 1980 haben Hanifin und Rajka diagnostische Kriterien etabliert, die bis heute in allen internationalen Studien Verwendung finden. Es gibt die vier Hauptkriterien – massive Pruritis, Ekzeme in charakteristischer Morphologie und Lokalisation, chronischer oder rezidivierender Verlauf und positive Atopie-Anamnese – sowie Nebenkriterien, zu denen erhöhte Serum IgE Werte und positive Befunde beim Prick- und Intrakutantest mit Allergenen gehören. Der Verlauf ist abhängig von exogenen und emotionalen Faktoren (STRINGL G., 2004). Des Weiteren können auch die sekundär auftretenden Infektionen der Haut als diagnostisches Kriterium herangezogen werden. Auch bei nicht kompliziert verlaufenden Veränderungen der Haut ist eine vermehrte Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* nachzuweisen (HANIFIN und RAJKA, 1980; LEYDEN et al., 1974)

Hauptkriterien:

- Pruritis
- typische Morphe und Lokalisation: Lichenifikation und vergrößerte Hautfalten der Beugen bei Erwachsenen; bei Kindern Gesichts- und Streckseitenbeteiligung
- chronischer oder chronisch-rezidivierender Verlauf
- positive Eigen- oder Familienanamnese für Atopie (Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, Atopische Dermatitis)

Nebenkriterien:

- Xerodermie
- Ichthyosis vulgaris (hyperlineare Palmae, folliculäre Hyperkeratosen)
- positive Hauttests vom Soforttyp
- erhöhtes Serum-IgE
- früher Erkrankungsbeginn
- Neigung zu Hautinfektionen (besonders *Staphylococcus aureus* und Herpes simplex)
- Neigung zu Hand- und Fußekzemen

- Mamillenekzem
- Cheilitis, Perioralekzem
- Pityriasis alba
- Rhagaden (Unterlippe, Mundwinkel, retroaurikulär)
- rezidivierende Konjunktivitis
- infraorbitale Lidfalte (Dennie-Morgan-Zeichen), Lidekzem
- laterale Reduktion der Augenbrauen (Hertoghe-Zeichen)
- Augenveränderungen (Keratokonus, Katarakt)
- halonierte Augen
- Gesichtsblässe, Gesichtsekzem
- Halsfalten
- Juckreiz durch Schwitzen
- Wollunverträglichkeit
- Nahrungsmittelunverträglichkeit
- weißer Dermographismus

(HANIFIN und RAJKA, 1980)

In Europa hat sich, um einen objektiven Schweregrad ermitteln zu können, der SCORAD Index durchgesetzt. Dieser wurde von der European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD) entwickelt. Dieses Scoringsystem berücksichtigt die flächenhafte Ausdehnung der Hautveränderungen. Die Intensität einzelner Symptome, Erythem, Ödem-/Papelbildung, Nässen/Krustung, Excoriationen, Lichenifikation und die in unbetroffenen Hautarealen anzutreffende Hauttrockenheit werden jeweils mit Werten von 0 (nicht vorhanden) bis 3 (stark) bewertet. Als letzte zu ermittelnde Größe werden die subjektiven Symptome Juckreiz und Schlaflosigkeit jeweils auf einer Skala von 1–10 bewertet; 1 (geringe Ausprägung), 10 (sehr starke Ausprägung). Die maximal zu erreichende Punktzahl ist 103 (ORANJE et al., 2007; HANIFIN und RAJKA, 1980). Dieses System wurde für Kinder entwickelt, findet aber dennoch Anwendung bei Erwachsenen. Es ist sehr aufwendig, verbindet objektive und subjektive Daten miteinander und ist stark durch die subjektiven Beobachtungen des Arztes und des Patienten oder Eltern beeinflusst. Um diese Effekte zu verringern, wurde der SCORAD Index vereinfacht, durch Streichung der durch den Patienten vorgenommenen Bewertung. Beim nun erlangten objective SCORAD ist die Maximalpunktzahl 83. Eine weitere Reduktion des objective SCORAD auf

nur noch drei zu bewertende Kriterien – Erythem, Ödem und Excoriationen – führt zum TIS (three-item severity score). Dieses System mit maximal 9 zu vergebenen Punkten erlaubt eine sehr schnelle Bewertung. Bei allen Scores ist immer die am stärksten betroffene Hautstelle zu bewerten. Mit den etablierten Scores kann ein Monitoring der Krankheit und eine Einordnung in verschiedene Schweregrade – milde, moderate oder schwere Ausprägung – durchgeführt werden (ORANJE et al., 2007).

2.3.3 Therapie

Die Behandlung von AD kann auf sehr unterschiedlichen Wegen erfolgen. Es kommen viele verschiedene Medikamente und Therapien in Frage. Die Basis der Therapie sollte eine konsequente tägliche Pflege der Haut bilden. Aufgrund des chronischen Verlaufs ist eine Anpassung an den momentanen Status der AD vonnöten. Zu den komplementären Therapieansätzen fehlen derzeit kontrollierte wissenschaftliche und aussagekräftige Studien (AWMF (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN), 2011).

Medikamentöse Therapie:

- topische Basistherapie
- topische Glukokortikosteroide
- topische Calcineurinantagonisten
- Antipruriginosa
- Steinkohleteerhaltige Präparate
- antimikrobielle und antiseptische Substanzen
- Antihistaminika
- Mastzellstabilisatoren (Cromoglycinsäure) und Ketotifen
- spezifische Immuntherapie
- orale Glukokortikosteroide
- Ciclosporin
- Azathioprin
- Mycophenolat Mofetil (MMF)
- Methotrexat

- Interferone
- Anti-IgE
- Laktobazillen
- Phototherapie

(AWMF (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN), 2011)

Nichtmedikamentöse Verfahren:

- Neurodermitisschulung
- Eliminationsdiäten
- Essentielle Fettsäuren
- Hausstaubmilbenreduktion

Stufentherapie der Neurodermitis:

Die Wahl der Therapie muss für jeden AD-Patienten individuell getroffen werden. Sie ist abhängig von Ausbreitung und Intensität der Hautläsionen, Alter und dem Leidensdruck der Patienten. Es wird ein mehrstufiger Plan erstellt, der an Patienten individuell angepasst werden muss. Beispielhaft zu sehen an der Empfehlung der AWMF in Abbildung 2.3.

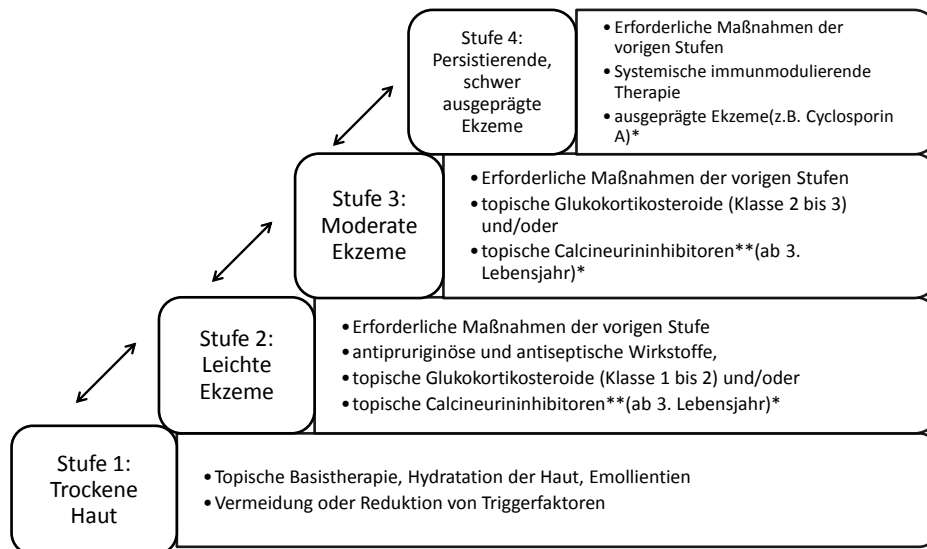


Abbildung 2.3 Stufenplan Therapie

*Eine UV- Therapie ist häufig ab Stufe 2 unter Berücksichtigung der Altersbeschränkung (nicht im Kindesalter) indiziert.

**Firstline Therapie: In der Regel topische Glukokotikosteroide, bei Unverträglichkeit/Nichtwirksamkeit und an besonderen Lokalisationen (Gesicht, Intertrigines) topische Calcineurininhibitoren (Second-Line-Medikamente) (AWMF (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN), 2011)

2.4 Tiermodelle Atopische Dermatitis

Bisher sind viele verschiedene Tiermodelle zur AD entwickelt und beschrieben worden. Jedes einzelne zeigt eine spezielle Ausprägung von AD-ähnlichen Symptomen.

2.4.1 Spontane Entwicklung von Atopischer Dermatitis

Zu diesen Modellen gehören Tiermodelle, die spontane Mutationen zeigen, zum Beispiel die Nc/Nga Maus (MATSUDA et al., 1997; KAWAKAMI et al., 2007). Bei diesem Modell kommt es bei den Tieren unter nicht sterilen Haltungsbedingungen zu spontanen Veränderungen der Haut. Die klinischen und histologischen Symptome sind denen des Menschen mit AD sehr ähnlich. Die Hautveränderungen zeigen sich im Gesicht, Nacken, an den Ohren und an der dorsalen Haut. In den veränderten Hautarealen wurden vermehrt Mastzellen und CD4+ T-Zellen gefunden. In diesem Modell zeigen sich, ähnlich wie beim Menschen, ab der achten Lebenswoche erhöhte IgE-Serumwerte. Unter Haltungsbedingungen, die spezifisch pathogen frei sind entwickeln diese Tiere keine Symptome (MATSUDA et al., 1997).

2.4.2 Transgene Mäuse mit Über- oder Unterexpressionen

Durch eine Überexpression von IL-4 – einem wichtigen Zytokin von Th2-Zellen – in der Epidermis kann eine Hautentzündung ausgelöst werden. Diese Tiere zeigen alle Schlüsselphänomene der AD. Die typischen Hautveränderungen zeigten sich bei einem Großteil der Tiere an den dünn behaarten Hautstellen wie Ohren, Nacken, Augen und Gesicht. Weitere Veränderungen, die beobachtet werden konnten, sind Konjunktivitis und *Staphylococcus aureus* Infektion. In der Histopathologie zeigten sich die typischen AD-Symptome: Infiltration der Haut mit T-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und Eosinophilen. Im Serum konnten erhöhte Werte für IgE und IgG1 gefunden werden (CHAN et al., 2001).

Außerdem wurden genetisch veränderte Tiere mit einer Überproduktion vom SC chymotropic Enzym entwickelt. Dieses Enzym ist in chronischen Läsionen von AD- und Psoriasispatienten erhöht. Transgene Tiere, die in ihren suprabasalen epidermalen Keratinozyten eine Überexpression des SC chymotropic Enzym zeigen, entwickeln spontan charakteristische AD-Veränderungen. Diese Mäuse entwickeln verdickte Haut, Hautentzündungen und Juckreiz (HANSSON et al., 2002).

2.4.3 Chemisch- oder allergen-induzierte Modelle

Des Weiteren wurden Tiermodelle, in denen der Effekt durch wiederholte Applikation von Allergenen und haptenerenden Argenzen erzeugt wird, entwickelt. Zu nennen sind hier unter anderem Hausstaubantigene. Kawakami et al. haben das Modell von Matsuda (MATSUDA et al., 1997) dahingehend verbessert, dass unter SPF-Bedingungen bei Nc/Nga Mäusen AD ausgelöst werden konnte. Die gezielte wiederholte Konfrontation mit Hausstaub und Staphylococcal Enterotoxin B löst die für AD charakteristischen Effekte, z.B. Anstieg von IgE und Hautläsionen, aus (KAWAKAMI et al., 2007).

2,4,6-Trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) wurde in verschiedenen Mausstämmen, z.B. BALB/c und NC/Nga, als haptenerendes Argens eingesetzt. In diesen Tieren zeigten sich die erwünschten Veränderungen. Matsumoto et al. haben TNCB bei Nacktmäusen angewendet, um die Haut ohne Fell intensiver beobachten zu können. Die Haut wurde jeden zweiten Tag über 36 Tage mit 1% TNCB behandelt. Dieses Vorgehen führte zu reduzierter Hautfeuchte, erhöhtem trans-epidermalen Wasserverlust und gesteigerter Hautdicke. In histopathologischen Untersuchungen zeigte sich eine Verringerung der Größe jedes einzelnen Keratinozyten sowie vermehrte Anwesenheit von CD4 und CD8 positiven T-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen. (MATSUMOTO et al., 2004).

Ein weiteres haptenerendes Argens, das unter anderem auch in Tiermodellen für akute Kontaktdermatitis eingesetzt wird, ist Oxazolon. Oxazolon bewirkt eine chronische Th2 Zell-ähnliche hypersensitive Reaktion. Durch wiederholte Applikation werden Symptome und pathologische Veränderungen induziert, die

der menschlichen Krankheit ähneln. Neun- bis zehnmaliges Auftragen der Oxazolnlösung auf die Haut von Nacktmäusen führte zu einer chronischen TH2-Zelllastigen hypersensitiven Reaktion. Die Expression von Proteinen zur Differenzierung von Fillagrin, Loricrin und Involucrin wurde durch dieses Vorgehen gestört. Der vermehrte trans-epidermale Wasserverlust, bedingt durch die veränderte Hautbarriere sowie der verminderte Anteil von Ceramiden im Stratum Corneum waren miteinander assoziiert. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Aktivität von Serin-Protease im Stratum corneum erhöht ist.

Durch die Vielzahl der Tiermodelle ist es möglich, immunologische und strukturelle Veränderungen unter verschiedenen Bedingungen in der Haut zu beobachten. Durch die Untersuchung in diesen Mäusen sollen neue Erkenntnisse über die pathologischen Mechanismen, die im Menschen wirken, gewonnen werden.

2.5 Mäuse mit humanem Immunsystem

Zur Verbesserung der Tiermodelle war es notwendig, Maus-Mensch-Chimären zu erzeugen. Dies ist entweder durch transgene Tiere oder Tiere, die nach der Geburt mit menschlichen Zellen besiedelt werden, geschehen. Drei große wissenschaftliche Fortschritte in der Züchtung von Mausinzuchtstämmen haben es ermöglicht, Mäuse mit einem humanisierten Immunsystem zu generieren.

Der erste Meilenstein war 1983 die Entdeckung der Prkdc^{scid} in CD17 Mäusen (BOSMA et al., 1983). Weitere Versuche mit diesem Stamm zeigten, dass sich in diesen Mäusen humane Zellen ansiedeln können. Dies konnte durch humane PBMC (MOSIER et al., 1988), fetale hämapoetische Zellen (MCCUNE et al., 1988) oder HSC (LAPIDOT et al., 1992) erfolgen. Allerdings reichte der Spiegel der Rekonstitution, bedingt durch noch Vorhandensein von Maus B und T Zellen sowie NK-Zellen, nicht für ein funktionsfähiges Immunsystem aus (GREINER et al., 1998).

1995 folgte durch Kreuzungsversuche die Entdeckung, dass die Scid-Mutation in Verbindung mit Nod-Hintergrund ein besonders hohes Rekonstitutionslevel erlaubt. Die Vereinigung dieser beiden Erkenntnisse stellte sich als die beste Basis

für ein erfolgreiche Rekonstitution heraus. In dieser Kombination ist die Aktivität der NK-Zellen deutlich geringer als in CB17-scid-Mäusen (SHULTZ et al., 1995; HESSELTON et al., 1995; CHRISTIANSON et al., 1996). Dennoch konnten auch durch weitere genetische Varianten einige Beschränkungen nicht überwunden werden. Weiterhin war die Lebenszeit relativ begrenzt und die Restaktivität der NK-Zellen sowie andere Teile des Immunsystems beeinflussten die Rekonstitution.

Abschließend konnte das Rekonstitutionslevel durch gezielte Mutation des Interleukin-2 γ -chain locus nochmals stark verbessert werden. Diese Kette ist eine wichtige Komponente in Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 und wirkt bei der Signalübertragung durch diese Rezeptoren mit (SUGAMURA et al., 1996). T- und B-Zellen können sich bei Abwesenheit der Interleukin-2 γ -Kette nicht korrekt entwickeln und nicht ihre Funktion erfüllen. Ein weiterer großer Vorteil ist die komplett gestörte Entwicklung von NK-Zellen, sodass diese nicht mehr nachgewiesen werden können (OHBO et al., 1996; SHULTZ et al., 2007; ITO et al., 2002).

2.5.1 Nod-scid IL2 R γ -chain^{null}

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm wurde 2005 von Leonard D. Shultz et al. in den Jackson Laboratories in Bar Harbor gezüchtet und beschrieben. Der NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWjl}/Sz (abgekürzt als Nod-scid IL2 R γ -chain^{null}) Stamm wurde durch mehrere Zuchtschritte erzeugt.

Als erstes wurden weibliche NOD-scid mit männlichen B6.129S4-IL2R γ ^{tm1Wjl/J} verpaart. Da das IL2R γ Mutation auf dem X Chromosom lokalisiert ist, wurde im nächsten Schritt die Generation (NOD X B6) F_1 + scid IL2 R γ -chain^{null}) mit NOD-scid-Weibchen zurückgekreuzt. Nach zwei weiteren Rückkreuzungsgenerationen wurden die weiblichen Tiere, die homozygot für scid und heterozygot die Mutation am IL2R γ tragen, durch Durchflusszytometrie und PCR identifiziert. Es wurden acht weitere Generationen, durch Rückkreuzung des IL2R γ Allels auf den NOD-scid Hintergrund, erzeugt.

NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2R γ ^{Tm1Wjl/Sz} Weibchen wurden mit NOD-scid IL2R γ ^{null}/Y Männchen verpaart. Die Nachkommen mit den erwünschten Eigenschaften wurden durch PCR identifiziert und das Ergebnis mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Die Abwesenheit von der Expression der IL-2R γ Kette auf Blutzellen konnte auf diese Weise nachgewiesen werden. Durch Inzucht mit NOD-scid IL2R γ ^{null} Weibchen und NOD-scid IL2R γ ^{null}/Y Männchen wurde dieser genetische Hintergrund im neuen Stamm etabliert (SHULTZ et al., 2005).

Dieser Stamm zeichnet sich durch folgende phänotypische, histologische und funktionale Eigenschaften des Immunsystems aus:

In der Histologie zeigen sich im Thymus nur noch Stromazellen mit sporadischen zystischen Strukturen.

In der Milz können keine Follikel mehr nachgewiesen werden.

Des Weiteren sind die Lymphknoten deutlich kleiner als bei den Ursprungslinien.

Die Lebenszeit der Tiere beträgt Median >89 Wochen. Sie sterben deutlich seltener als die Ursprungslinien und wenn, dann später an Lymphomen. Verglichen mit NOD-scid Tieren zeigt der neue Stamm eine um den Faktor 2 geringere Anzahl von kernhaltigen Zellen in der Milz. Es können keine reifen (CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺) T Zellen und B220⁺IgK⁺ B Zellen gefunden werden. Alle Zellen in der Milz exprimieren MHC I Rezeptoren, aber nur in geringen Teilen MHC Klasse II. Im Blut sind deutlich weniger Leukozyten zu finden und es ist kein Immunglobulin im Serum nachweisbar. Wie bereits durch die Selektion erwünscht, zeigt sich auch eine deutlich verminderte NK-Zell-Zytotoxizität. DC Zellen von Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} Tieren zeigen in Zellkultur eine abnormal geringe Produktion von TNF- α ⁺ und CD86⁺ DC Zellen. Außerdem ist es ihnen nicht möglich, IL-12p40 oder IFN- γ zu produzieren (SHULTZ et al., 2005).

2.5.2 Rekonstitution

Bereits 1988 gelang es Mosier et al. in Mäusen ein funktionales humanes Immunsystem zu erzeugen. Dies wurde durch den Transfer von humanen peripheren hämatopoetischen Zellen erreicht (MOSIER et al., 1988). Darauf folgend wurde dies mit verschiedenen Zellisolaten und Behandlungskonzepten der Tiere durchgeführt.

Die HSC für die Rekonstitution können auf unterschiedliche Weise gewonnen werden. Es besteht die Möglichkeit, aus Knochenmark – durch Zytokine mobilisierte Zellen –, aus peripherem Blut oder aus Nabelschnurblut HSC zu gewinnen (SCHMITZ und BARRETT, 2002). Eine weitere Option ist, die Rekonstitution mit humanen PBMC durchzuführen (BERNEY et al., 2001).

Um das Ergebnis zu verbessern, werden häufig die Empfängertiere vorbereitet. Durch Bestrahlung der Tiere vor der Zellinjektion, die intravenös, intraperitoneal oder bei sehr jungen Tieren intrakardial erfolgt, kann der Erfolg der Rekonstitution verbessert werden (SHULTZ et al., 2005). Es können Antikörper gegen NK-Zellen, anti GM1 oder TM- β 1 (LAZARUS et al., 1997), monoklonale Antikörper gegen Granulocyten (SANTINI et al., 1998) oder chemische Mittel gegen Makrophagen verabreicht werden (SHIBATA et al., 1998).

3 Publikation

Induction of Oxazolone Mediated Features of Atopic Dermatitis in NOD-scid IL2R2 γ -chain^{null} Mice Engrafted with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Thomas Nolte VD¹

Maryam Zadeh-Khorasani Ph.D²

Orkhan Safarov MD²

Franziska Rueff³

Rita Varga Dr. med³

Nadja Herbach PD Dr. med. vet.⁴

Rüdiger Wanke Prof. Dr. med. vet.⁴

Andreas Wollenberg Prof. Dr. med.³

Thomas Mueller Prof. Dr.⁵

Roswitha Gropp Dr. ²

Eckhard Wolf Prof. Dr. med. vet.¹

Matthias Siebeck Prof. Dr. med.²

¹Institute of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, and Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

²Department of Surgery and

³Department of Dermatology, University Clinic Munich, 80336 Munich, Germany

⁴Institute of Veterinary Pathology, LMU Munich, 80539 Munich, Germany

⁵Julius von Sachs Institute, University of Würzburg, 87082 Würzburg, Germany

Veröffentlicht in Disease Models & Mechanism DMM 2013

Induction of oxazolone-mediated features of atopic dermatitis in NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells

Thomas Nolte¹, Maryam Zadeh-Khorasani², Orkhan Safarov², Franziska Rueff³, Rita Varga³, Nadja Herbach⁴, Rüdiger Wanke⁴, Andreas Wollenberg³, Thomas Mueller⁵, Roswitha Gropp^{2,*}, Eckhard Wolf¹ and Matthias Siebeck²

SUMMARY

Animal models mimicking human diseases have been used extensively to study the pathogenesis of autoimmune diseases and the efficacy of potential therapeutics. They are, however, limited with regard to their similarity to the human disease and cannot be used if the antagonist and its cognate receptor require high similarity in structure or binding. Here, we examine the induction of oxazolone-mediated features of atopic dermatitis (AD) in NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The mice developed the same symptoms as immunocompetent BALB/c mice. Histological alterations induced by oxazolone were characterized by keratosis, epithelial hyperplasia and influx of inflammatory cells into the dermis and epidermis. The cellular infiltrate was identified as human leukocytes, with T cells being the major constituent. In addition, oxazolone increased human serum IgE levels. The response, however, required the engraftment of PBMC derived from patients suffering from AD, which suggests that this model reflects the immunological status of the donor. Taken together, the model described here has the potential to evaluate the efficacy of therapeutics targeting human lymphocytes *in vivo* and, in addition, might be developed further to elucidate molecular mechanisms inducing and sustaining flares of the disease.

INTRODUCTION

A large number of new drug candidates fail in clinical trials for a variety of reasons, including insufficient activity or unforeseen toxicity. This most probably reflects the predictive quality of the preclinical animal models and the difficulty in translating positive data in animal models to the patient. The pathophysiological mechanisms in the genetically heterogeneous and often aged patient population differ markedly from those observed in animals. This is particularly relevant for the 12-week-old inbred specific pathogen-free (SPF)-bred mouse, which is used widely for the development of disease models and efficacy profiling of new drugs to include potential treatment of chronic immuno-inflammatory disorders.

Atopic dermatitis (AD) is a relapsing chronic inflammatory disease of the skin characterized by rash, pruritus, eczema, xerosis and lichenification (Elias and Steinhoff, 2008; Elias et al., 2010). AD is a T-helper cell type 2 (T_H2)-driven inflammation, with interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) playing key roles in

the early edematous phase (Wollenberg et al., 2000; Kaminishi et al., 2002; Obara et al., 2002). Both interleukins activate the type II IL-4 receptor complex, which consists of IL-4 receptor α and IL-13 receptor $\alpha 1$, resulting in the generation of phenotypic symptoms such as IgM-IgE switch, fibrosis, epithelial hyperplasia and barrier dysfunction (Grewe et al., 1994; Mueller et al., 2002; Elias et al., 2003).

One animal model that closely reflects these features is the oxazolone-induced AD in hairless mice (Man et al., 2008). When applied to the skin of hairless mice in low doses for a period of 3 weeks, mice develop symptoms characteristic for AD including barrier dysfunction, secretion of IgE, epithelial cell hyperplasia, fibrosis and infiltration of inflammatory cells into the dermis and epidermis and secretion of T_H2 cytokines. Although this model is useful in many respects, it does not reflect the variability observed in patients and cannot be used when murine protein structures and binding mechanism significantly differ from their human counterparts.

NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are an attractive model for the study of human diseases (Shultz et al., 2007b; King et al., 2008). So far, humanized mice have been used to study autoimmune type 1 diabetes (Shultz et al., 2007a), thyroiditis (D'Eufemia et al., 1992) and rheumatoid arthritis (Tighe et al., 1990; Davis et al., 2002). Here, we report the development of oxazolone-induced AD-like features in NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with PBMC derived from patients suffering from AD. Mice developed the same features as those previously observed in immunocompetent mice. Challenge with oxazolone resulted in epithelial hyperplasia, keratosis and infiltration of inflammatory cells (consisting mainly of human T cells) into the dermis and epidermis. Engraftment alone without further treatment was not sufficient to induce AD. However, in

¹Institute of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, and Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

²Department of Surgery and ³Department of Dermatology, University Clinic Munich, 80336 Munich, Germany

⁴Institute of Veterinary Pathology, LMU Munich, 80539 Munich, Germany

⁵Julius von Sachs Institute, University of Würzburg, 87082 Würzburg, Germany

*Author for correspondence (roswitha.gropp@med.uni-muenchen.de)

Received 18 November 2011; Accepted 15 July 2012

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly cited and all further distributions of the work or adaptation are subject to the same Creative Commons License terms.

TRANSLATIONAL IMPACT

Clinical issue

Atopic dermatitis (AD) is a relapsing, chronic inflammatory skin disease characterized by rash, pruritus, eczema, xerosis and lichenification. Many animal models have been developed to study the disease *in vivo*; one involves exposing the skin of hairless mice to oxazolone, a haptenizing agent that induces many features of human AD. However, this model does not recapitulate the variability observed in human AD patients, and it cannot be used to study mechanisms or test drugs that involve human-specific molecules or mechanisms. Thus, similar to many other disease models, better models of AD are required to increase the potential of preclinical trials to test new drug candidates for activity and toxicity.

Results

This study describes a new model of AD involving oxazolone-induced pathology in immune-compromised mice engrafted with human peripheral mononuclear cells (PBMCs). On treatment with oxazolone, mice engrafted with PBMCs from AD patients – but not with PBMCs from healthy donors – developed the same pathological signs as observed in immunocompetent oxazolone-exposed mice, including epithelial hyperplasia, IgE secretion and infiltration of inflammatory cells into the dermis and epidermis. Importantly, however, the cellular infiltrate was of human origin, predominantly T cells, as was the IgE. Unlike the model involving immunocompetent mice, symptoms were also observed in response to ethanol (used as a control) in the new model, suggesting that primed lymphocytes from AD patients respond to ethanol as a contact allergen.

Implications and future directions

This report introduces a new *in vivo* model of AD involving cells from patients, opening up opportunities to study human-specific molecules and mechanisms in this disease. The data suggest that applying this model in AD research might improve the predictability of future phase II clinical trials, as it more closely represents the heterogeneity and complexity of AD patients than previously established models.

contrast to the results obtained in immunocompetent mice, ethanol alone induced AD-like symptoms albeit milder than observed with oxazolone. Mice engrafted with PBMC derived from healthy volunteers and non-engrafted mice did not respond to oxazolone challenge, which suggests that in this specific model development of AD is dependent on the presence of lymphocytes from patients with a history of AD.

RESULTS

Selection of donors

In light of the previous observation that atopic milieus support immunological responses (Reichle et al., 2011), we decided to use PBMC isolated from patients suffering from AD for engraftment. Three patients were selected who exhibited a SCORAD (severity scoring of atopic dermatitis) index between 16 and 48. The cells were first analyzed *in vitro* with regard to their capacity for IL-4-mediated IgE secretion, which was a requirement for their use in the mouse study. PBMC were isolated and incubated as previously described (Kobayashi et al., 2009). Some 4×10^6 cells were incubated for 14 days in the presence (50 ng/ml) or absence of IL-4. The induction of human IgE (hIgE) and human IgG (hIgG) synthesis was measured in the supernatant by immunoassay and turbidimetric measurement, respectively. PBMC from all three patients responded to the exposure of IL-4 with increased synthesis of hIgE, whereas hIgG levels remained unaffected. IgE levels

increased by a factor of 166 from 2.13 ± 1.8 ng/ml in the control sample to 332 ± 87.2 in the treated sample. A group of healthy volunteers without any known history of atopic diseases served as control. We also observed the responsiveness of PBMC to IL-4 in this group. Expression levels increased from 0.92 ± 1 ng/ml to 104 ± 85 ng/ml. For the animal studies, we selected one donor with no responsiveness to IL-4 and one donor who responded to IL-4 with similar elevated hIgE levels as the AD patients.

Engraftment of NOD-scid IL2R γ^{null} mice with PBMC and induction of immunological responses

In all experiments NOD-scid IL2R γ^{null} mice were divided into two groups: those engrafted with PBMC derived from patients suffering from AD and those engrafted with PBMC from healthy volunteers without any history of atopic diseases (non-AD). On day one, NOD-scid IL2R γ^{null} mice were engrafted with 4×10^6 PBMC from the selected donors as described in Methods.

Animals were treated with IL-4 (AD $n=5$; non-AD $n=8$), ethanol (AD $n=16$; non-AD $n=9$) or oxazolone (AD $n=17$; non-AD $n=9$) as described in Methods. For the challenge, engrafted animals were divided into two cohorts: animals treated with oxazolone and animals treated with ethanol (AD1, oxazolone $n=8$ or ethanol $n=7$; AD2, oxazolone $n=6$ or ethanol $n=5$; AD3, oxazolone $n=3$ or ethanol $n=4$; non-AD1, oxazolone $n=4$ or ethanol $n=4$; non-AD2, oxazolone $n=5$ or ethanol $n=5$). A cohort of non-engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice challenged with oxazolone served as control ($n=4$). To compare the immunological responses to those of immunocompetent mice, a cohort of BALB/c mice challenged with oxazolone ($n=9$) and ethanol ($n=9$) according to the same regimen as the engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice was included in this study.

Appearance of the skin, weight loss and behavioral changes and hIgG and hIgE were monitored throughout the experiment. In the oxazolone-treated cohort of BALB/c mice we observed pruritus, reddening of the skin and mild scaling, whereas the ethanol group was unaffected (data not shown). However, the pathomorphological changes seemed less pronounced than in hairless mice. In the group of engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice we observed reddening of the skin and the appearance of scales and eczema upon treatment only in rare cases, suggesting that the inflammatory response was less pronounced than in immunocompetent mice.

Neither the BALB/c nor the engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice developed epithelial barrier loss, as indicated by transepithelial water loss levels, which did not change throughout the experiment (data not shown).

None of the engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice developed symptoms of AD spontaneously, nor did they show any symptoms of graft versus host disease (GVHD). The behavior of all mice was normal and they did not lose weight throughout the experiment; on the contrary, most of the animals gained weight. The median weight gain in the oxazolone-challenged group was +2.1% and +0.8% in the ethanol-challenged group.

Histological analysis of the skin

In order to clarify whether oxazolone had an effect on the architecture of the skin, skin sections from BALB/c mice and engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice treated with oxazolone or ethanol were analyzed. Non-challenged BALB/c mice, BALB/c mice challenged with ethanol and non-engrafted SCID mice treated with

Induction of AD in engrafted mice

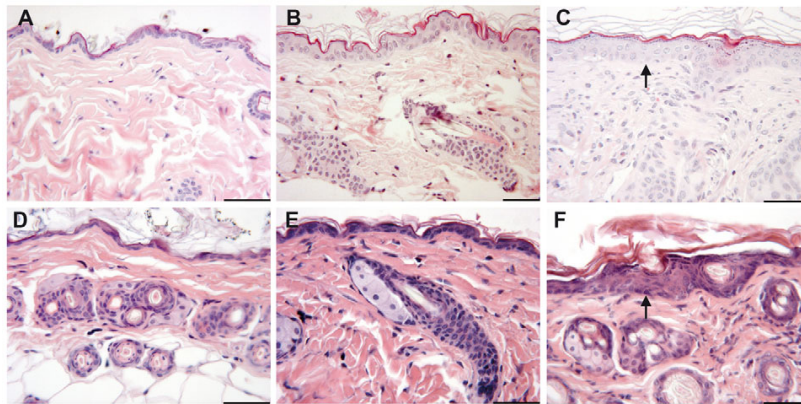


Fig. 1. Challenge with oxazolone results in epithelial hyperplasia and influx of inflammatory cells into the epidermis and dermis and keratosis as observed in immunocompetent mice. (A-C) HE-stained photomicrographs of skin sections from BALB/c mice: (A) no treatment, (B) challenged with ethanol and (C) challenged with oxazolone. (D-F) HE-stained skin sections from NOD-scid IL2R γ^{null} mice: (D) non-engrafted no treatment, (E) non-engrafted challenged with oxazolone and (F) engrafted challenged with oxazolone. Arrows indicate epithelial hyperplasia. Scale bars: 50 μm .

oxazolone served as controls in this experiment. As shown in Fig. 1F, NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with PBMC derived from a patient suffering from AD displayed the same morphological changes as the immunocompetent counterpart (Fig. 1C). Epithelial hyperplasia was accompanied by influx of inflammatory cells and keratosis. By contrast, non-engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice treated with oxazolone did not display any alterations (Fig. 1E) and looked similar to the skin of untreated and non-engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice (Fig. 1D). BALB/c mice challenged with ethanol as carrier showed slightly increased keratosis.

In order to identify the cellular infiltrate as human leukocytes, sections from the skin were stained with an antibody directed against human CD45 (Fig. 2A). Human leukocytes infiltrated the epidermis and dermis in engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice challenged with oxazolone (Fig. 2Ad). As expected, leukocytes in skin sections of BALB/c challenged with ethanol or oxazolone (Fig. 2Aa,Ac) and of non-engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice (Fig. 2Ab) were not stained with this antibody. The cellular infiltrate consisted mainly of T cells (Fig. 2B). An antibody directed against murine and human CD3 identified T cells in the epidermis and dermis of both, oxazolone treated BALB/c and engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice (Fig. 2Bc,Bd). BALB/c mice treated with ethanol displayed a scarce infiltration of cells into the dermis and epidermis (Fig. 2Ba). No cells were stained in the skin of non-engrafted controls (Fig. 2Bb).

Stained sections of skin samples from all treated groups were classified according to a histological score as described in Methods. NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with PBMC derived from a donor with no atopic history served as control. This analysis revealed a major difference between immunocompetent mice and mice with a humanized immune system. The control group treated with carrier alone did not respond to the challenge. By contrast, in engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice, we observed histological alterations in the ethanol-challenged group, albeit in most cases less severe than in the oxazolone-challenged group (Fig. 3). The median value of the assessed histological score in the oxazolone-treated group was 2 ($n=12$) as compared with 0 in the ethanol-challenged group ($n=13$). Surprisingly, in the cohort engrafted with PBMC with no atopic history almost no alterations were visible (oxazolone $n=9$, ethanol $n=9$). Statistical analysis (Kruskal-Wallis

followed by multiple comparisons) revealed a statistically significant difference between the oxazolone-treated groups with and without atopic history ($P<0.001$ for AD versus non-AD mice treated with oxazolone). In the ethanol-challenged group, the difference was statistically insignificant ($P=0.22$ for AD versus non-AD mice treated with ethanol).

Secretion of human IgG and human IgE in response to challenge with ethanol and oxazolone

In order to analyze hIgG and hIgE levels, blood samples were taken from engrafted mice at day 23 and these immunoglobulins were measured by turbidimetric immunoassay in the serum of the mice. Human IgG levels were also taken as a proof of successful engraftment of the animals. Human IgG concentrations below detection levels ($<0.2 \mu\text{g/ml}$) were considered as indicative of non-engraftment and respective animals were excluded from the study (AD, oxazolone $n=3$, ethanol $n=3$; non-AD, $n=0$). All measurements were performed in two groups: mice engrafted with PBMC derived from patients suffering from AD and mice engrafted with PBMC derived from two healthy volunteers without any history of atopic diseases. All PBMC were analyzed simultaneously in vitro for their capacity to respond to IL-4. Fig. 4 depicts individual levels of hIgE of the respective donors in response to IL-4 under cell culture conditions. In order to compare the responsiveness of PBMC in vitro and in vivo, a cohort of animals was treated with IL-4 in addition to the cohorts treated with ethanol or oxazolone. As shown in Fig. 4A, engrafted animals treated with IL-4 in both groups (AD and non-AD) showed similar hIgG levels as observed previously (King et al., 2008). We observed a high variability, with levels reaching a mean value of $66.8 \pm 81 \mu\text{g/ml}$ versus $63.0 \pm 86 \mu\text{g/ml}$ in the non-AD group. There was no difference between these values and those from engrafted animals without any treatment (data not shown). Administration of ethanol or oxazolone apparently had an impact on hIgG levels in the AD and non-AD groups, although the change in levels did not reach statistical significance. The variability was high; some animals did not show a rise in hIgG levels like the untreated group and some animals responded significantly. The ethanol-treated group reached values of $907 \pm 1834 \mu\text{g/ml}$ and the oxazolone-treated group values of $304 \pm 395 \mu\text{g/ml}$. There was, however, no correlation between the observed histological score

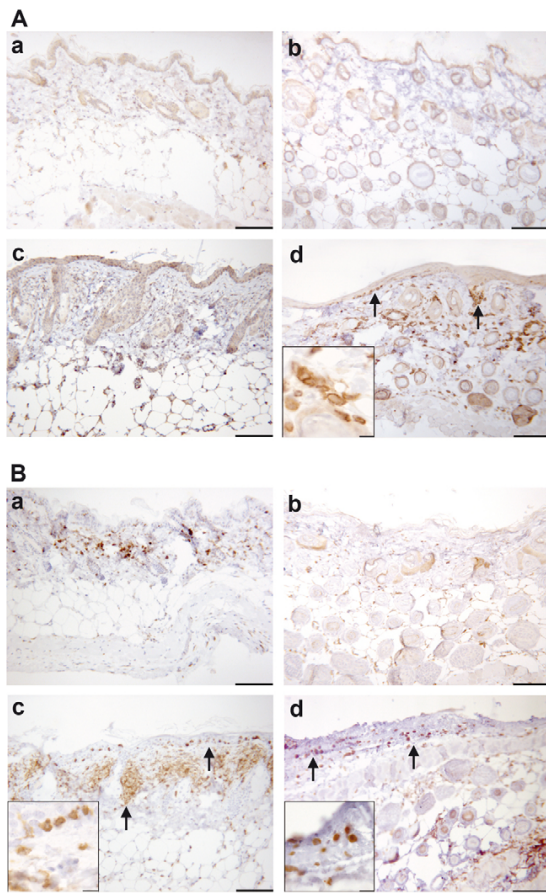


Fig. 2. Upon challenge with oxazolone, human leukocytes (mainly consisting of T cells) infiltrate the dermis and epidermis.

(A,B) Photomicrographs of immunohistochemically stained paraffin sections of the skin: (A) stained with anti-hCD45 antibody and (B) stained with anti-CD3 antibody. Skin samples for both A and B were taken from the following mice: BALB/c mouse challenged with ethanol (a); non-engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mouse (b); BALB/c mouse challenged with oxazolone (c); and engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mouse treated with oxazolone (d). Arrows indicate invaded human leukocytes. Scale bars: 100 μm ; 10 μm (insets).

and the IgG levels, indicating that IgG levels were not related to pathomorphological changes. Pearson product moment analysis revealed a correlation coefficient of -0.0065 and a P value of 0.66 .

In contrast to exposure to IL-4 in vitro, where hIgE levels of PBMC derived from patients with AD increased by a factor of 166 from 2.13 ± 1.8 ng/ml in the control sample to 332 ± 87.2 ng/ml in the IL-4-treated sample, hIgE levels did not increase in engrafted animals treated with IL-4 (Fig. 4B). In the AD and non-AD groups, hIgE concentrations leveled at 1 ± 1.6 ng/ml and 0.27 ± 0.54 ng/ml, respectively. Values did not differ from values obtained in non-treated animals. The pattern, however, changed significantly when animals were challenged with oxazolone or ethanol. In the non-AD group, neither treatment had an impact on hIgE levels, which remained as low as in the IL-4-treated group. By contrast, oxazolone

and ethanol induced the secretion of hIgE in the AD group. Although some animals remained irresponsive and the variability was high, IgE levels in the four different groups were significantly different. Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons revealed a significant difference between the oxazolone- and ethanol-treated groups and the IL-4-treated group ($P=0.01$ and $P=0.01$, respectively). In addition, there was a correlation between hIgE levels and the histological score. Pearson product moment analysis revealed a correlation coefficient of -0.511 and a P value of 6×10^{-5} .

This observation was in contrast to results obtained in BALB/c mice treated with oxazolone and ethanol. As previously observed in hairless mice, murine IgE levels remained unaffected in ethanol-treated mice and increased significantly in the oxazolone-treated group. In this study, BALB/c mice exhibited basal IgE levels of 495 ± 252 ng/ml prior to treatment and reached values of 2671 ± 830 ng/ml in the oxazolone-treated group ($P < 0.05$, compared with untreated mice) and 721 ± 384 ng/ml in the ethanol-treated group ($P=0.5$, compared with untreated mice) at day 23 post treatment.

FACS analysis of lymphocytes in blood, skin and spleen

In order to analyze engraftment levels and the ratio of CD4 to CD8 T cells in peripheral blood, skin and spleen, lymphocytes from engrafted mice were subjected to FACS analysis at day 30 post engraftment, which corresponded to day 23 post treatment. Engraftment levels varied considerably ranging from 0.2 to 73%, with a median engraftment level of 1.5%. As expected, there was a strong correlation of engraftment levels and hIgG levels ($P=0.001$); however, there was no correlation between engraftment levels and hIgE ($P=0.15$), engraftment levels and histological score ($P=0.3$) and hIgG levels and hIgE levels ($P=0.32$). In addition, there was no negative correlation between engraftment levels and weight changes. High and low level engrafted animals gained weight similarly, indicating that there was no onset of GVHD.

The ratio of CD4 to CD8 was compared to the original ratio in peripheral blood of the respective donors. The ratio was determined in three different donors. One donor suffered from AD and displayed a ratio of 2.1 at time of engraftment. The two healthy volunteers (non-AD1 and non-AD2) differed with respect to the capacity of the isolated PBMC to secrete IgE in vitro (Fig. 4B) and in their respective CD4:CD8 ratio at time of engraftment. PBMC from non-AD1 secreted low levels of IgE and displayed a CD4:CD8 ratio of 1.4, whereas PBMC from non-AD2 secreted IgE at similar levels to PBMC isolated from the AD patient and also exhibited a similar CD4:CD8 ratio of 2.4. As shown in Fig. 5, this pattern was preserved in engrafted mice. CD4:CD8 ratios of human lymphocytes in the spleen and peripheral blood reflect the ratio detected in the whole blood at time of engraftment. The challenge with oxazolone did not influence the ratio in mice engrafted with PBMC derived from non-AD1.

DISCUSSION

In this study we describe the induction of oxazolone-mediated features of AD in immune-compromised NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with human PBMC derived from patients with AD. Upon treatment with oxazolone, engrafted mice developed the same characteristics as previously observed in immunocompetent mice, which include epithelial hyperplasia, infiltration of inflammatory

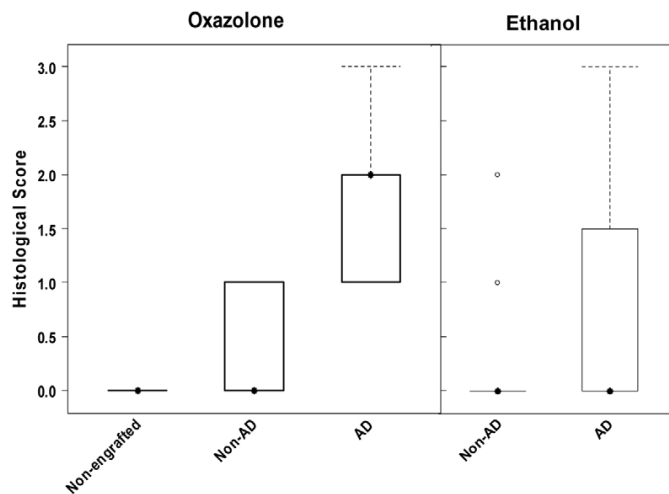


Fig. 3. Challenge with oxazolone results in histological changes in NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with PMBCs derived from patients with AD. Histological changes were classified according to a histological score and depicted in a boxplot diagram. Sample sizes: non-engrafted $n=4$, non-AD $n=9$ and AD $n=12$. $P<0.01$ for AD vs non-AD treated with oxazolone. $P=0.22$ for AD versus non-AD treated with ethanol (Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons).

cells into the dermis and epidermis and IgE secretion (Man et al., 2008) and effects also seen in our experiments using BALB/c mice. As shown by immunohistochemistry and FACS analysis, the cellular infiltrate was of human origin with T cells being the major constituent.

Of note, the presence of human lymphocytes was alone not sufficient to induce AD-like features. Mice engrafted with PBMC derived from patients suffering from AD without any further treatment neither developed any symptoms of AD spontaneously nor exhibited increased IgE levels. Additional stimulation by irritation of the skin by treatment with oxazolone or ethanol was necessary to produce an effect. Furthermore, treatment with oxazolone without engraftment did not induce any alterations in the skin architecture. Non-engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice treated with oxazolone displayed no epithelial hyperplasia or keratosis. Thus, epithelial hyperplasia was strictly dependent on the presence of PBMC.

Impact of the immunological background of the donor

Our results strongly suggest that the immunological background and phenotype of the engrafted cells are important with respect to mounting an immunological response resulting in AD-like features. Mice engrafted with PBMC derived from individuals without any history of atopic diseases did not react to treatment. These mice were unresponsive to treatment with regard to IgG and IgE secretion, cellular infiltration and epithelial hyperplasia. Furthermore, an elevated CD4:CD8 ratio is not sufficient to induce atopic dermatitis like features. Engraftment with PBMC derived from a healthy donor who displayed a similar ratio as the AD donor did not result in the development of phenotypic symptoms in response to challenge with oxazolone. These results suggest that the immunological status of the donor was not influenced by the challenge but that the engrafted cells were only able to execute what they had previously 'learned'. Thus, in these experiments the development of AD-like features was dependent on the presence of PBMC derived from patients with AD.

This is in contrast to our results from experiments with BALB/c mice and to previous results obtained in hairless mice (Man et al.,

2008). Both are immunologically naïve strains with respect to AD and were able to elicit an immunological response upon challenge with oxazolone. Oxazolone is thought to have a dual function, acting as a haptenizing agent in addition to activating STAT6-mediated secretion of chemokines (Koeper et al., 2007). Because engrafted PBMC are incompetent to generate a robust immune response de novo (Shultz et al., 2007b), the function of oxazolone might be restricted to its role as an activator of previously primed lymphocytes via activation of keratinocytes. The absence of peripheral lymph nodes and dendritic cells, which constrain the development of a peripheral immune system, might limit the potential of PBMC in this experimental setting. Hence, the model depends on previously primed immune cells.

The FACS analysis of T cells in peripheral blood, splenic and skin lymphocytes corroborates the results obtained from the analysis of hIgE secretion and the histological score. In either organ the ratio of CD4 to CD8 cells reflected the disease status of the donor. In T cell populations of peripheral blood from the healthy donor, the ratio remained unaffected in splenic lymphocytes upon engraftment. Challenge with oxazolone did not affect this ratio, suggesting that the status of the cell remained unchanged and that, unlike BALB/c mice, the engrafted immune cells were resistant to immunological stimulation.

The CD4:CD8 ratio of peripheral blood from the patient or of engrafted T cells isolated from spleen, peripheral blood and skin from engrafted mice indicated a CD4-dominated immunological background vigilant to mount an allergic response. However, we would not conclude from these results that only PBMC primed by a history of AD have the capacity to induce these features. Further experiments are required to investigate whether an atopic background such as, for example, found in allergies is sufficient to elicit similar responses.

Under these conditions, stimulation with IL-4 in vivo did not result in the development of symptoms or hIgG and hIgE secretion in engrafted mice. This is in contrast to previous results that showed induction of IgE secretion in response to IL-4 in vivo (Spiegelberg et al., 1994; Mayer et al., 2000). Both protocols involve the intraperitoneal application of 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ for 5 consecutive days. The

RESEARCH ARTICLE

Induction of AD in engrafted mice

Disease Models & Mechanisms • DMM

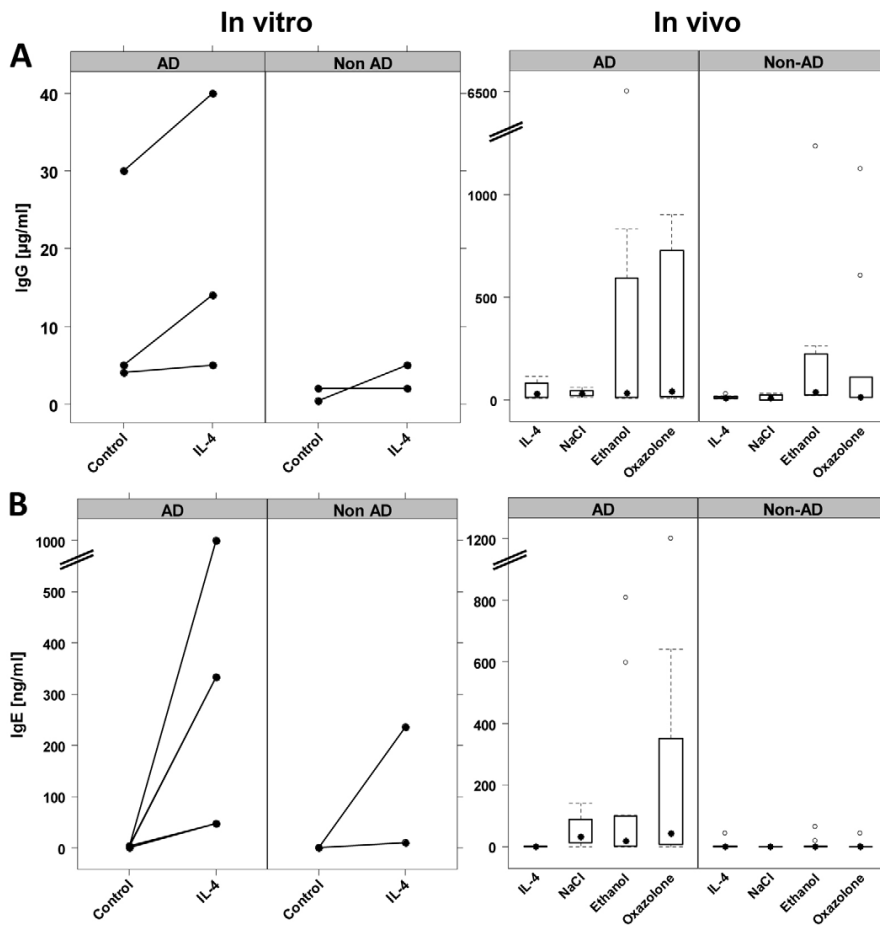


Fig. 4. Treatment-dependent human IgG and IgE secretion. (A,B) PBMC derived from three different patients suffering from AD and from two healthy volunteers (non-AD) were analyzed in vitro and in vivo with respect to their capacity to secrete human IgG (A) and IgE (B). Sample sizes: in vitro AD $n=3$; in vitro non-AD $n=2$; in vivo AD after treatment with IL-4 $n=5$, NaCl $n=4$, ethanol $n=13$ or oxazolone $n=12$; in vivo non-AD after treatment with IL-4 $n=8$, NaCl $n=4$, ethanol $n=8$ or oxazolone $n=9$. (A) hIgG secretion. IL-4 had moderate effects on IgG levels in vitro and in vivo, whereas ethanol and oxazolone induced the secretion of hIgG. (B) hIgE secretion. IL-4 induced IgE secretion in vitro in the AD group and in one donor of the non-AD group, whereas in vivo IL-4 failed to induce hIgE in both groups. Ethanol and oxazolone induced hIgE secretion in the AD group but not the non-AD group. IgE levels in the four different groups were significantly different. Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons revealed that the oxazolone- and ethanol-treated groups were significantly different to the IL-4-treated group ($P=0.01$ and $P=0.01$, respectively).

results in both experiments differed significantly with respect to detected IgE levels (11.915 ng/ml and 200-1000 ng/ml, respectively). The clearance in mice is very fast. In normal mice, the IL-4 serum level was ~600 ng at 5 hours after injection of 10 µg IL-4 and declined with a half-life of 20 minutes (Spiegelberg et al., 1994), indicating that approximately after 6-7 hours the serum level was below the required concentration. The lack of response in our experiments was not due to the incapability of the engrafted PBMC to respond to IL-4, as shown by in vitro experiments. Here, the same cells that failed to respond to IL-4 in vivo, secreted IgE upon exposure to IL-4. We observed, however, that a single incubation with 50 ng IL-4 for 24 hours was not sufficient to induce IgE secretion. Without continuous exposure to IL-4 the cells were unable to secrete IgE (data not shown). Because the group of IL-4-treated mice displayed the same pattern as untreated engrafted mice and did not display IgG levels beyond basal levels, the irresponsiveness is most probably due to the short half-life of IL-4 and the limited exposure to IL-4 in vivo. One explanation for the discrepancy of our results to those of Spiegelberg and Mayer might be that the required exposure times to IL-4 are different in different mouse strains or dependant on the number of engrafted cells. In

previous experiments, CB.17 scid mice were used for in vivo induction of hIgE and six to ten times more PBMC were engrafted.

The fact that Biedermann et al. observed the activation of dendritic cells in BALB/c mice in response to a single application of 0.1 or 1 µg of IL-4 (Biedermann et al., 2001) suggests that long-term exposure might only be required for the IgM-IgE class switch. Bioavailability of IL-4 is still an unsolved problem in the use of IL-4 and IL-4 muteins as therapeutic agents in diseases like psoriasis and AD (Röcken, 2010) and slow release formulations might improve the in vivo induction of IgE in our experimental setting.

Differences in responses of immunocompetent BALB/c mice

Although the NOD-scid IL2R γ^{null} mice engrafted with PBMC derived from patients suffering from AD showed the same features of AD as observed in immunocompetent mice, there were some differences in the results obtained in BALB/c mice. First of all, the immunological response in BALB/c mice was restricted to the oxazolone-treated group. Levels of IgE increased throughout challenge with oxazolone and hardly changed upon ethanol challenge. In engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice, however, an immunological response could also be observed in ethanol-

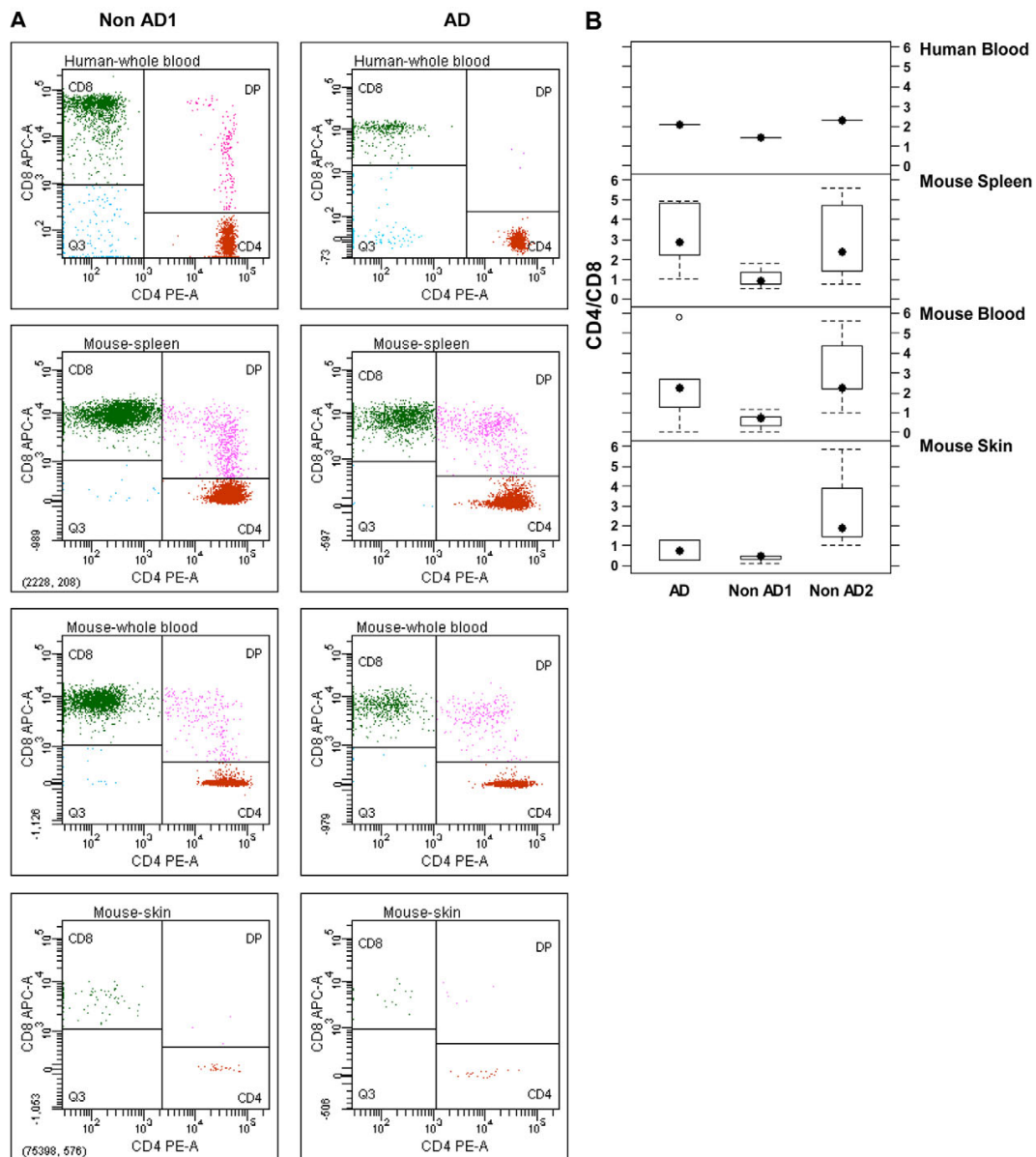


Fig. 5. Immunological background of the donor determines the CD4:CD8 ratio in organs of engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice. (A,B) CD4:CD8 ratio of human T cells in the spleen, blood and skin of mice engrafted with PBMC derived from a patient suffering from AD and two healthy volunteers (non-AD) was compared with the CD4:CD8 ratio in whole blood from the respective donors prior to engraftment. (A) Representative flow cytometric analysis of human T cells stained with anti-human CD4 and CD8. (B) Quantitative analysis of CD4:CD8 ratio. Sample sizes: AD $n=4$, non-AD1 $n=4$ and non-AD2 $n=7$.

treated mice. At the end of the experiment, the level of IgE expression varied considerably in both groups (oxazolone- or ethanol-treated), reaching from levels below detection level up to 1286 ng/ml regardless of treatment. The observation that treatment with ethanol did statistically change IgE levels might reflect the milder capacity of ethanol as an irritant. Even shaving

and depilation seemed to sufficiently irritate the skin in some cases. In addition, in every cohort there were mice that did not respond at all to treatment. In 4 out of 12 animals, levels of hIgE remained below detection level, as seen in the IL-4-treated or untreated groups, suggesting that either the stimulus was not sufficient under these conditions or that the response was delayed.

Because the response in BALB/c mice was also not as pronounced as observed in hairless mice, differences in the robustness of hairy skin as compared with hairless skin might also lower susceptibility.

The secretion of hIgE was paralleled by the secretion of hIgG. Most mice with hIgG levels beyond basal levels also expressed hIgE. Basal levels were similar to those previously observed (King et al., 2008). In this analysis we also observed a high variability in each cohort, ranging from 18 µg/ml to a maximum of even 6680 µg/ml regardless of the treatment. It might therefore be expected that increases in histological scores would have been observed in both the oxazolone- and ethanol-treated groups. Indeed, in some mice treated with ethanol alone we observed an influx of inflammatory cells and alterations of the skin architecture similar to the oxazolone-challenged mice, albeit milder, suggesting that exposure to ethanol might be sufficient to elicit an immunological response in PBMC bearing a lifelong history of exposure to allergens.

A further important discrepancy between the results obtained in BALB/c mice and those obtained in NOD-scid IL2R γ^{null} mice was the observed high variability of the histological score and levels of IgE secretion in the oxazolone-challenged group. Unexpectedly, treatment resulted in the development of symptoms or left mice unaffected. In every cohort of mice engrafted with PBMC derived from patients, we observed mice with basal IgG levels and IgE levels below detection limit.

In summary, we have shown that in engrafted NOD-scid IL2R γ^{null} mice human lymphocytes perform similar functions as resident lymphocytes in immunocompetent BALB/c and hairless mice. Thus, this model might be useful for studying the efficacy of therapeutics targeting human lymphocytes in vivo. Furthermore, it might be a useful substitute for studies that have to be performed in primates due to the requirement for a high homology of protein structures. In light of the immunological and phenotypic background of engrafted PBMC produced by exposure to allergens and/or disease, we feel confident that this model could eventually be developed into a model with greater similarity and translatability to the human disease, to potentially include elucidation of cellular mechanisms inducing and sustaining flares of the disease.

METHODS

Isolation and engraftment of human PBMC

Peripheral blood was collected from three patients suffering from AD and two healthy volunteers. All donors gave informed written consent and the study was approved by the ethic commission of the University of Munich.

PBMC were isolated following a protocol established at the Helmholtz Zentrum Munich. 30 ml of blood in trisodium citrate solution was diluted with 30 ml of HANKS Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) and loaded on Leucosep Tubes (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany). Cells were separated at 800 g for 15 minutes according to the manufacturer's instruction. PBMC were isolated, washed in HANKS Balanced Salt Solution supplemented with 2500 IE Heparin Natrium (Braun) and resuspended in PBS at a concentration of 20×10^6 /ml.

At least 6-week-old NOD-scid IL2R γ^{null} mice were engrafted with 200 µl of the cell suspension by intravenous injection. The animals were rested for 7 days prior to first challenge with oxazolone. The mean age was 15.5 ± 5.51 weeks and the mean weight 25.2 ± 3.3 g. Animals were randomized for age and sex.

Cell culture and stimulation assay

PBMC (4×10^6 cells) were resuspended in 2 ml RPMI containing 10% FCS, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin and 1% glutamine (Sigma) and incubated for 14 days in 24-well flat-bottom cell culture plates (Greiner Bio-One) with IL-4 (50 ng/ml) and 1 µl anti-CD40 (1 µg/ml; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ as previously described (Kobayashi et al., 2009).

Production of wild-type IL-4

Wild-type human IL-4 was produced in *Escherichia coli* as described (Kruse et al., 1991). Briefly, the cDNA encoding for the mature part of human IL-4 was cloned into the *E. coli* expression vector RBSIIP_{N25X/O} (Stueber et al., 1984). Transformed *E. coli* cells of the strain BL21(DE3) were grown in Luria-Bertani (LB) medium to an optical density of 0.6 at 600 nm. Protein expression was induced by addition of 1 mM isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG), expression was continued for further 3 hours. Cells were harvested by centrifugation and lysed by ultrasonication. IL-4 was expressed in insoluble form as inclusion bodies, which were dissolved in 20 volumes (v/w) of 6 M guanidinium hydrochloride (GuHCl), 50 mM Tris-HCl pH 8.0. The denatured protein was refolded by a two-step protocol, the first step being a rapid fivefold dilution of the protein solution in 6 M GuHCl in ice-cold water. The solution was stirred for 15 minutes and then dialyzed against 20 volumes PBS (20 mM sodium phosphate, 120 mM NaCl and 2 mM KCl, pH 7.4) for 24 hours at 4°C. Insoluble protein precipitate was removed by centrifugation and clear supernatant was loaded onto a cation exchange column (CM Sepharose FF; GE Healthcare). IL-4 was eluted by applying a linear gradient of 0-1 M sodium chloride in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. IL-4-containing fractions were pooled and subjected to a second purification employing reversed phase HPLC chromatography. High purity IL-4 protein was eluted using a linear gradient of 0.1% trifluoroacetic acid to 100% acetonitrile. Purity was checked by SDS-PAGE and ESI-FT-ICR mass spectrometry. Biological activity and receptor binding properties were examined by measuring the IL-4 dose dependency of TF-1 cell proliferation as described (Tony et al., 1994) and by determining the binding affinity of the recombinant IL-4 protein to its high-affinity receptor IL-4R α via surface plasmon resonance as published (Shen et al., 1996).

Study protocol

BALB/c@Rf mice were obtained from Janvier Europe. NOD/LtSz-scid (abbreviated as NOD) IL2R γ^{null} mice were obtained from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany). The mice were kept under conventional SPF conditions in individually ventilated cages. The facility is controlled by FELASA guidelines. All animal studies were approved by the Ethics Committee for animal use of the government of Upper Bavaria, Germany and performed in compliance with German animal welfare laws and policies.

At least 6-week-old BALB/c mice or NOD-scid IL2R γ^{null} mice at 7 days post engraftment were treated as previously described (Man et al., 2008). Following anesthesia with isoflurane, a 2×2 cm of the regio lumbalis dexter and sinister was shaved and depilated on day 1 and animals were presensitized by topical application of 20 µl 5% oxazolone (4-ethoxymethylene-2-phenyl-oxazolin-5-one)

Induction of AD in engrafted mice

(Sigma-Aldrich) in 100% ethanol. From day 8, mice were rechallenged with 200 µl 0.1% oxazolone in 100% ethanol by topical application every other day. Animals were sacrificed on day 23. Control groups were challenged according the same protocol using ethanol or isotonic sodium chloride solution. Mice were inspected daily and the weight was controlled on day 1, and from day 8 on every other day.

For analysis of IL-4 induction, 200 µl of IL-4 (50 µg/ml) in isotonic in sodium chloride solution was administered intraperitoneally from day 8 to day 12 post engraftment (Spiegelberg et al., 1994; Mayer et al., 2000).

Histological score

Skin regions in the regio lumbalis dexter and sinister of the mice, which had direct contact with the agents, were fixed for 24 hours in formalin, followed by preservation in 70% ethanol prior to paraffin embedding. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and Giemsa. Inflammation was scored as follows: (0) infiltration of few inflammatory cells into dermis, (2) major infiltration of inflammatory cells into the dermis and (3) infiltration of the epidermis. Alterations of skin architecture were scored as follows: (0) no alteration, (1) epithelial hyperplasia, (0) no fibrosis, (1) fibrosis. The resulting score parameters were added in a total histological score ranging from 0 (healthy) to 5 (maximal histological damage). The determination of the score was supported by a trained pathologist ignorant of the treatment status of the animals.

Serum IgG and IgE levels

Samples were blinded and human serum IgG levels were measured turbidimetrically with COBAS INTEGRA 800 (Roche, Penzberg, Germany). Human serum IgE levels were measured by the Elecsys 2010 Immunoassay (Roche). Murine IgE levels were analyzed by ELISA (BD Biosciences).

Immunohistochemistry

Tissue samples of the skin were fixed for 24 hours in 4% neutral buffered formalin, and embedded in paraffin. Antigen retrieval was performed by incubating slides for 30 minutes at 95-100°C in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 9). Non-specific binding was blocked with normal goat serum (1:10; MP Biomedicals, Solon, OH). Sections were incubated with rabbit anti-human CD3 (1:100; Dako, Hamburg, Germany) for 1 hour at room temperature in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) and rabbit anti-human CD45 (1:400 in TBS; Antibody Online, Aachen, Germany) for 1 hour at room temperature. A biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG was used as secondary antibody (1:100 in TBS; Dako), DAB served as chromogen. Sections were analyzed by a Leitz microscope (10×) and micrographs were taken with a Leitz camera DFC 295.

Analysis of lymphocytes by flow cytometry

Anti-human CD3-FITC (clone SK7), anti-human CD4-PE (clone SK3), anti-human CD8-APC (clone SK1), anti-human CD45-APC-H7 (clone 2D1) and anti-mouse CD45-PE-Cy7 (clone 30-F11) were purchased from BD Biosciences. To analyze human and murine lymphocytes, multicolor cytometric analysis was performed using a FACS Canto (BD Biosciences) and FACS Diva software.

Human peripheral blood was taken from the vein in EDTA tubes. At time of sacrifice peripheral mouse blood was collected in EDTA tubes from the anesthetized mouse by cardiocentesis. Blood (100 µl) was stained with appropriated antibodies and incubated for 15 minutes at room temperature and in darkness. The erythrocytes were removed from the samples using 1× BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences) for 10 minutes at room temperature and in darkness.

Single cell suspensions were prepared from the spleen in RPMI-1640 containing 10% FCS by mincing with a metal mesh followed by a 100 µm cell strainer (BD Biosciences). The cells were treated by 1× BD Pharm Lyse (BD Biosciences) for 10 minutes at room temperature. After a washing process in 2% RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), 10⁶ cells/ml were labeled with appropriated antibodies.

Skin lymphocytes were isolated as previously described (Gebhardt et al., 2009). Shaved mouse skin (1-2 cm) was cut into small pieces and incubated for 1.2-2 hours at 37°C in Eagle's minimum essential medium containing 2% FCS (Gibco BRL), collagenase type I (6 mg/ml; Worthington) and DNase (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) with occasional swirling, followed by filtering through a 70-µm cell strainer (BD Biosciences). The cells were collected in 10% RPMI-1640 and were stained with appropriate antibodies.

After staining, the cells were washed in FACS buffer (PBS containing 2% FCS) and resuspended in 500 µl of the same buffer. For all analyses, anti-mouse CD45 staining was performed to exclude murine host cells and only human CD45+ cells were included in the analyses. At least 10,000 events were measured using FACS Canto (BD Biosciences). Post-acquisition data was analysed using the FlowJo 7.6.5 software (Tree Star, Ashland, OR).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R, a free software environment for statistical computing and graphing. The Kruskal-Wallis test was performed to evaluate statistical significance. Correlations were analysed by Person-Product-moment analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Eric Whalley for critically reading the manuscript, Lisa Pichl for excellent technical assistance and Origenis GmbH for generous support.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing or financial interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.N. performed experiments and data analysis; M.Z.-K. performed experiments and data analysis; O.S. performed experiments; F.R. recruited patients and performed anamnesis; R.V. recruited patients and performed anamnesis; N.H. performed the histological scoring and edited the manuscript, R.W. edited the manuscript; A.W. analyzed data; T.M. provided and analyzed IL-4 and edited the manuscript; R.G. performed experiments, analyzed data, developed the approach and prepared the manuscript; E.W. and M.S. developed the approach and edited the manuscript.

FUNDING

This work was funded by the Bundesministerium für Forschung und Technik [grant number PTJ 0315466].

REFERENCES

- Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gumy, A., Egeter, O., Sakrauski, A. K., Seegmüller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A. D. et al. (2001). IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat. Immunol.* **2**, 1054-1060.
- D'Eufemia, P., Giardini, O., Cantani, A., Martino, F. and Finocchiaro, R. (1992). Autoimmune thyroiditis in a case of tyrosinaemia type III. *J. Inher. Metab. Dis.* **15**, 861-862.

RESEARCH ARTICLE

Induction of AD in engrafted mice

- Davis, L. S., Sackler, M., Brezinschek, R. I., Lightfoot, E., Bailey, J. L., Oppenheimer-Marks, N. and Lipsky, P. E. (2002). Inflammation, immune reactivity, and angiogenesis in a severe combined immunodeficiency model of rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* **160**, 357-367.
- Elias, J. A., Lee, C. G., Zheng, T., Ma, B., Homer, R. J. and Zhu, Z. (2003). New insights into the pathogenesis of asthma. *J. Clin. Invest.* **111**, 291-297.
- Elias, P. M. and Steinhoff, M. (2008). "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1067-1070.
- Elias, P. M., Williams, M. L., Crumrine, D. and Schmuth, M. (2010). Inherited disorders of corneocyte proteins. *Curr. Probl. Dermatol.* **39**, 98-131.
- Gebhardt, T., Wakim, L. M., Eidsmo, L., Reading, P. C., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524-530.
- Grewe, M., Gyufko, K., Schöpf, E. and Krutmann, J. (1994). Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* **343**, 25-26.
- Kaminishi, K., Soma, Y., Kawa, Y. and Mizoguchi, M. (2002). Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. *J. Dermatol. Sci.* **29**, 19-25.
- King, M., Pearson, T., Shultz, L. D., Leif, J., Bottino, R., Trucco, M., Atkinson, M. A., Wasserfall, C., Herold, K. C., Woodland, R. T. et al. (2008). A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin. Immunol.* **126**, 303-314.
- Kobayashi, S., Haruo, N., Sugane, K., Ochs, H. D. and Agematsu, K. (2009). Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells. *Hum. Immunol.* **70**, 35-40.
- Koeper, L. M., Schulz, A., Ahr, H. J. and Vohr, H. W. (2007). In vitro differentiation of skin sensitizers by cell signaling pathways. *Toxicology* **242**, 144-152.
- Kruse, N., Lehnbecher, T. and Sebald, W. (1991). Site-directed mutagenesis reveals the importance of disulfide bridges and aromatic residues for structure and proliferative activity of human interleukin-4. *FEBS Lett.* **286**, 58-60.
- Man, M. Q., Hatano, Y., Lee, S. H., Man, M., Chang, S., Feingold, K. R., Leung, D. Y., Holleran, W., Uchida, Y. and Elias, P. M. (2008). Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 79-86.
- Mayer, R. J., Bolognese, B. J., Al-Mahdi, N., Cook, R. M., Flambert, P. L., Hansbury, M. J., Khandekar, S., Appelbaum, E., Faller, A. and Marshall, L. A. (2000). Inhibition of CD23 processing correlates with inhibition of IL-4-stimulated IgE production in human PBL and hu-PBL-reconstituted SCID mice. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 719-727.
- Mueller, T. D., Zhang, J. L., Sebald, W. and Duschl, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 237-250.
- Obara, W., Kawa, Y., Ra, C., Nishioka, K., Soma, Y. and Mizoguchi, M. (2002). T cells and mast cells as a major source of interleukin-13 in atopic dermatitis. *Dermatology* **205**, 11-17.
- Reichle, M. E., Chen, L., Lin, S. X. and Chan, L. S. (2011). The Th2 systemic immune milieu enhances cutaneous inflammation in the K14-IL-4-transgenic atopic dermatitis model. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 791-794.
- Röcken, M. (2010). Interleukin 4 or cytokine antagonists? Time to change the search for novel psoriasis therapies. *Dermatology* **221**, 27-29.
- Shen, B. J., Hage, T. and Sebald, W. (1996). Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. A biosensor study employing recombinant interleukin-4-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **240**, 252-261.
- Shultz, L. D., Ishikawa, F. and Greiner, D. L. (2007a). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 118-130.
- Shultz, L. D., Pearson, T., King, M., Giassi, L., Carney, L., Gott, B., Lyons, B., Rossini, A. A. and Greiner, D. L. (2007b). Humanized NOD/LtSz-scid IL2 receptor common gamma chain knockout mice in diabetes research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1103**, 77-89.
- Spiegelberg, H. L., Beck, L., Kocher, H. P., Fanslow, W. C. and Lucas, A. H. (1994). Role of interleukin-4 in human immunoglobulin E formation in hu-PBL-SCID mice. *J. Clin. Invest.* **93**, 711-717.
- Stueber, D., Ibrahim, I., Cutler, D., Dobberstein, B. and Bujard, H. (1984). A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences. *EMBO J.* **3**, 3143-3148.
- Tighe, H., Silverman, G. J., Kozin, F., Tucker, R., Gulizia, R., Peebles, C., Lotz, M., Rhodes, G., Machold, K., Mosier, D. E. et al. (1990). Autoantibody production by severe combined immunodeficient mice reconstituted with synovial cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1843-1848.
- Tony, H. P., Shen, B. J., Reusch, P. and Sebald, W. (1994). Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. *Eur. J. Biochem.* **225**, 659-665.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Oppel, T. and Bieber, T. (2000). Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. *Clin. Exp. Dermatol.* **25**, 530-534.

4 Diskussion

Diese Arbeit beschreibt ein Tiermodell für Atopische Dermatitis in Nod-scid IL2 $R\gamma$ -chain^{null} Mäusen, die mit humanen PBMC rekonstituiert wurden. Durch die Rekonstitution dieser Tiere mit PBMC von AD-Patienten und durch die Stimulierung mit Oxazolone konnten Dermatitis ähnliche Merkmale hervorgerufen werden wie Hyperplasie der Epidermis, Einstrom von Entzündungszellen in Dermis und Epidermis und erhöhte Spiegel von hIgE im Serum. Der hierbei bestimmte histologische Score war in der Gruppe der Oxazolone behandelten Tiere signifikant erhöht. Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem hIgE Spiegel und dem histologischen Score festgestellt werden. Bei den infiltrierenden Zellen handelte es sich vorwiegend um T-Zellen, wie durch Durchflusszytometrie und Immunhistochemie gezeigt werden konnte. In dem in dieser Arbeit untersuchten Modell deckten sich die beobachteten Veränderungen der phänotypischen Merkmale mit denen, die in immunkompetenten Mäusen beobachtet wurden, (MAN et al., 2008), sowie früheren Ergebnissen in BALB/c Tieren. Kontrolltiere, die nicht rekonstituiert waren und mit Oxazolone stimuliert wurden, zeigten keine dieser Charakteristika. Dies bedeutet, dass zur Entwicklung der Merkmale die Rekonstitution mit PBMC notwendig war. Bemerkenswert ist, dass die alleinige Anwesenheit der humanen Zellen nicht ausreichend ist. Die Kontrolle mit Tieren, die rekonstituiert waren aber nicht behandelt wurden, zeigte keine Veränderungen. In dieser Gruppe konnte weder hIgE im Serum, Hyperplasie der Epidermis oder der Einstrom von Entzündungszellen in die Haut beobachtet werden. Das Versuchsregime zur Induktion mit Oxazolone scheint in diesem Modell notwendig zu sein. Des Weiteren konnten unter diesen Versuchsbedingungen keine Anzeichen von GVHD beobachtet werden. Diese wären zum Beispiel Gewichtsverlust, struppiges Fell und spezifische Abstoßungsreaktionen in der Haut.

4.1 Die Rolle des Spenders

Eine interessante Entdeckung der durchgeführten Versuche war, dass der immunologische Hintergrund der transplantierten Zellen einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hat. Mit diesem Stimulierungsregime waren nur die Zellen von AD-Patienten in der Lage die durch die Versuche in immunkompetenten Tieren zu erwartenden Ergebnisse zu erzeugen. Jene Tiere, die PBMC von Spendern ohne diagnostizierte atopische Erkrankung bekamen, zeigten keine Veränderungen. Diese Tiere zeigten keine epitheliale Hyperplasie, zelluläre Infiltration oder eine vermehrte hIgG/hIgE Ausschüttung. Die Vermutung liegt nahe, dass die Zellen nur das ausführen können, was sie bereits „gelernt“ haben. Die Stimulierung mit Oxazolone allein ist nicht ausreichend. Eine Erklärung hierfür ist, dass die rekonstituierten Mäuse nur eingeschränkt in der Lage sind, eine Immunantwort zu generieren (SHULTZ et al., 2005). Rekonstituierte Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} sind nicht in der Lage ein peripheres Immunsystem aufzubauen und eine vollwertige Immunantwort zu generieren. Eine mögliche Erklärung für die Aktivierung des Immunsystems in rekonstituierten Mäusen findet sich in der Wirkungsweise von Oxazolone. Oxazolone ist in der Lage, STAT 6 vermittelt, die Freisetzung von Chemokinen in Keratinocyten zu aktivieren. Den Lymphozyten ist es daraufhin möglich, auf diese zu reagieren (KOEPEL et al., 2007).

Die Beobachtung, dass dieses Tiermodell von PBMC von AD-Patienten abhängig ist, wird durch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie unterstützt. Durch die Stimulierung konnte keine Veränderung des CD4/CD8-Verhältnisses, im Vergleich zum Ausgangswert im Blut des Spenders, gefunden werden. Die Untersuchung wurde an Zellisolaten aus Milz, Haut und Blut durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Stimulierung den immunologischen Status der Zellpopulation seit der Rekonstitution nicht verändern konnte. Es erscheint spekulativ, anzunehmen, dass nur durch AD vorgeprägte PBMC brauchbar für dieses AD-Modell sind. Weitere Untersuchungen mit atopischen Spendern sind erforderlich, um zu ergründen, welche Eigenschaften für die Entwicklung des Phänotyps notwendig sind.

4.2 Unterschiede zu Untersuchungen mit immunkompetenten Mäusen

4.2.1 Die Stimulierung durch Ethanol

In immunkompetenten Tieren war die Entwicklung von charakteristischen Merkmalen der Atopischen Dermatitis lediglich an die Behandlung mit Oxazolone gekoppelt. In den bereits durchgeführten Versuchen in BALB/c Tieren und von Man et al. in Nacktmäusen, konnten durch Oxazolone die gewünschten Veränderungen verursacht werden (MAN et al., 2008). Beide Stämme sind immunologisch naiv in Bezug auf AD und waren in der Lage, eine vollständige Immunantwort zu generieren. Die Kontrollgruppen dieser Versuche, die nur mit der Trägersubstanz Ethanol behandelt wurden, zeigten keine phänotypischen Veränderungen. Dies war in den rekonstituierten Tieren dieses Modells anders. Die gemessenen hIgE Werte waren sowohl in der Ethanol- als auch in der Oxazolone-Gruppe erhöht. Die Serumwerte von hIgE am Ende des Beobachtungszeitraums schwankten in beiden Gruppen zwischen Werten, die nicht nachweisbar waren, und 1286 ng/ml hIgE. Wie in der Oxazolone-Gruppe war die Reaktion auf Ethanol von der Rekonstitution mit AD geprägten PBMC abhängig und ebenso wie in der Oxazolone-Gruppe wurde auch eine Veränderung des histologischen Scores beobachtet. Es zeigte sich der Einstrom von Entzündungszellen in die Dermis und Epidermis sowie eine Veränderung der Hautstruktur. Diese Effekte zeigten sich allerdings nicht so ausgeprägt wie in der Oxazolone-Gruppe. Ethanol ist dafür bekannt, milde Hautreaktionen auslösen zu können. Dies kann die Ursache für die gestiegenen hIgE Serumwerte und für die Erhöhung des histologischen Scores sein. In einigen seltenen Fällen schien das alleinige Scheren und Enthaaren ausreichend zu sein, um Hautirritationen auszulösen.

4.2.2 Erhöhte Variabilität

Im Vergleich zu den Experimenten mit BALB/c Mäusen wurde beobachtet, dass eine wesentlich höhere Variabilität bezüglich der gemessenen hIgE Werte und des

histologischen Scores vorliegt. In allen Kohorten von Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} Mäusen, die mit PBMC von AD-Patienten rekonstituiert waren, gab es Tiere, die nicht auf die Behandlung reagierten und solche, die eine starke Reaktion zeigten. Es war nicht vorherzusehen, welche Tiere eine Reaktion zeigen und welche nicht. Die wesentlich höhere Variabilität könnte mit dem stark schwankenden Ausmaß der Besiedlung durch PBMC erklärt werden. Die Rekonstitutionswerte schwankten zwischen 0,2% und 73%, Median 1,5%. Diese Variabilität spiegelt sich auch in den beobachteten IgG-Werten wider. Auch bei den hIgG-Werten zeigte sich eine große Spannbreite der Serumwerte in allen Versuchsgruppen. Sie reichte von 18 μ g/ml bis 6680 μ g/ml als höchsten gemessenen Wert. Die Basalspiegel bewegten sich in einer Größenordnung, die bereits beobachtet wurde (KING et al., 2008). Wie erwartet konnte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Rekonstitution und dem IgG-Spiegel festgestellt werden. Wenn die Sekretion von hIgG das Basallevel, das alle Tiere erreichten, überschritt, kam es fast immer auch zu einer Sekretion von hIgE. Es konnte jedoch keine Korrelation von hIgE- und hIgG-Spiegeln festgestellt werden. Dies bedeutet, dass eine ausreichende Rekonstitution nicht allein nur die Stimulierung der allergischen Reaktion verantwortlich ist. Die starke Erhöhung der hIgG-Werte kann auch in Hinweis darauf sein, dass bei einigen Tieren der IgM/IgG4/IgE switch noch nicht vollständig ist. Eine weitere Erklärung für die beobachtete Variabilität kann also auch in einer verzögerten oder nicht ausreichenden Stimulierung in diesem Modell liegen. Zusätzlich könnten stammspezifische Eigenschaften wie die Beschaffenheit der Haut eine Rolle spielen. Nacktmäuse zeigten beispielsweise eine deutlich stärkere Reaktionen als BALB/c Tiere. Die deutlich geringere Hautdicke und das vollkommene Fehlen von Haaren können eine Erklärung dafür liefern. Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} Tiere sind wie BALB/c Mäuse behaart.

4.2.3 Stimulierung mit hIL-4

Es war nicht möglich, im Mausmodell durch Injektion von hIL-4 Symptome der AD oder eine Ausschüttung von hIgG und hIgE zu induzieren. In Zellkulturexperimenten mit den gleichen Zellen, die zur Rekonstitution genutzt wurden, haben die Zellen auf die Gabe von IL-4 mit der Produktion von hIgE reagiert. In vivo zeigten die mit IL-4 behandelten Tiere die gleichen Serumwerte von hIgE und

hIgG wie die gänzlich unbehandelten Tiere, die als Kontrollgruppe fungierten. Eine der Ursachen für diese Beobachtungen ist in der kurzen Halbwertszeit von IL-4 zu suchen. Spiegelberg und Mitarbeiter konnten zeigen, dass IL-4 im Serum, fünf Stunden nach der Injektion von 10 µg IL-4, noch in einer Größenordnung von 600 ng nachgewiesen werden. Bei einer angenommenen Halbwertszeit von ca. 20 min ist davon auszugehen, dass nach 6–7 Stunden nicht mehr die benötigte Konzentration vorhanden ist (SPIEGELBERG et al., 1994). Es konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass für die Sekretion von hIgE eine Dauerstimulierung notwendig ist und dass die einmalige Stimulierung für 24 Stunden für die Produktion von IgE nicht ausreichend ist. Die hier beschriebenen Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu Ergebnissen, die in anderen Arbeitsgruppen erzielt wurden. In den vorherigen Arbeiten unterschieden sich die beobachteten IgE-Spiegel sehr stark. Sie bewegten sich in einer Bandbreite von 200 ng/ml bis 1000 ng/ml und 11915 ng/ml (MAYER et al., 2000; SPIEGELBERG et al., 1994). Da das Behandlungsregime identisch mit dem unsrigen war, könnte der Unterschied in den verwendeten Stämmen und in der Anzahl der rekonstituierten Zellen liegen. Beide Gruppen führten ihre Versuche mit CB.17 scid durch und verwendeten die zehnfache Menge der Zellen. Zurzeit ist die Bioverfügbarkeit von IL-4 und IL-4 Mutanten ein Problem in der Therapie, das noch gelöst werden muss, um diesen Therapieansatz vielversprechend gestalten zu können. Formulierungen, die eine langsame Abgabe des Wirkstoffs ermöglichen, sollten dieses Modell in diesem Punkt wesentlich verbessern können.

5 Zusammenfassung

Atopische Dermatitis ist eine nicht ansteckende chronische oder chronisch rezidivierende Hauterkrankung. AD ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen in der industrialisierten Welt. Eine große Zahl an Säuglingen, Jugendlichen und Erwachsenen leiden an den zum Teil starken Symptomen. Pruritis, Ekzeme in charakteristischer Morphologie und Lokalisation, chronischer oder rezidivierender Verlauf und positive Atopie-Anamnese sind die Hauptsymptome der AD.

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht geklärt. Es gibt zwei Hypothesen für die Entstehung von AD. Zum einen die Inside-Outside-Theorie, bei der davon ausgegangen wird, dass der primäre Defekt in einer Fehlregulation des Immunsystems liegt; und zum anderen die Outside-Inside-Theorie, deren Grundlage die Annahme ist, dass die zuerst gestörte Hautbarriere der auslösende Faktor ist. Beide Theorien werden durch Beweise gestützt.

Der hier verwendete Mausstamm Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} bietet die Möglichkeit, Tiere mit humanisiertem Immunsystem zu untersuchen. Die Rekonstitution des Immunsystems erfolgte mit PBMC aus AD-Patienten und gesunden Menschen, ohne bekannte atopische Vorerkrankung. In dieser Arbeit wurde versucht, in diesen Mäusen ein Oxazolon vermitteltes Modell für AD zu entwickeln. Die Tiere zeigten die gleichen Symptome wie immunkompetente BALB/c Mäuse. Hyperplasie der Dermis, Einstrom von Lymphozyten in Dermis und Epidermis sowie eine Erhöhung des im Serum befindlichen hIgE konnten erzielt werden. T-Zellen stellen den Hauptteil der in die Dermis und Epidermis einwandernden Zellen dar. Diese Beobachtungen waren abhängig von PBMC, die aus AD-Patienten gewonnen wurden und somit den zum Zeitpunkt der Injektion vorgefundenen Immunstatus repräsentierten. Es wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass in Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} Mäusen humane Lymphozyten in der Lage sind, ähnliche

Funktionen wie Lymphozyten in immunkompetenten Tieren zu erfüllen. Dies bietet die Möglichkeit, in diesem Modell in Zukunft neue Substanzen zur Behandlung von AD zu testen.

6 Summary

Atopic dermatitis is a non contagious chronic or recurring chronic inflammatory skin disease. AD is one of the most frequent chronic diseases in the industrial world. A high number of infants, children and adults suffer from the partly severe symptoms. The main symptoms of AD are pruritus, eczema with characteristic morphology and localization, chronic or recurring chronic courses and positive atopic histories.

The etiology of the disease is not clear. There are two hypotheses for the development of AD. According to the inside-outside-theory it is assumed that the primary defect lies in a defective regulation of the immune system. The outside-inside-theory is based on the assumption that the disordered skin barrier represents the main factor. For both theories supporting evidences were found.

The mouse strain Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} provides the possibility to investigate animals with a humanized immune system. Therefore, PBMC of patients with AD and patients without any known atopic disease were engrafted. In this work we tried to establish an oxazolone mediated model for AD. The animals showed the same features as immunocompetent BALB/c mice. Epithelial hyperplasia, keratosis and infiltration of dermis and epidermis as well as an increase of hIgE in the serum were achieved. T-cells are the main component of the cells which infiltrate the dermis and epidermis. The development of atopic like features was only observed when PBMC of AD patients were used for engraftment. Engrafted PBMC reflect the immunological status at time of engraftment. In Nod-scid IL2 R γ -chain^{null} mice human lymphocytes were able to fulfill similar functions as lymphocytes in immunocompetent mice. With this research and this model the possibility for a future investigation of new substances for the treatment of AD is given.

Literaturverzeichnis

AWMF (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN) (2011) *Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), der Österreichischen Gesellschaft für Dermatologie und Venerologie, des Arbeitskreises Pharmaökonomie in der Dermatologie, der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Dermatologie in der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, des Berufsverbandes der Kinder- und Jugendärzte, des Arbeitskreises Psycho-Dermatologie, der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie, des Berufsverbandes Deutscher Dermatologen, der Schweizerischen Gesellschaft für Dermatologie und Venerologie, der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, der Arbeitsgemeinschaft Neurodermitis-Schulung, der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Rehabilitation, des Deutschen Allergie- und Asthmabundes und der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe.* http://wwwawmforg/uploads/tx_szleitlinien/013-0271_s2e_Neurodermitis_01pdf.

BARNETSON R.S., WRIGHT A.L. und BENTON E.C. (1989) *IgE-mediated allergy in adults with severe atopic eczema..* Clin Exp Allergy **19**(3): 321–325.

BERNEY T., MOLANO R.D., PILEGGI A., CATTAN P., LI H., RICORDI C. und INVERARDI L. (2001) *Patterns of engraftment in different strains of immunodeficient mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes..* Transplantation **72**(1): 133–140.

BIEBER T. (2007) *The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI)..* Immunobiology **212**(6): 499–503. doi: 10.1016/j.imbio.2007.03.001.

- BOGUNIEWICZ M. und LEUNG D.Y.M. (2006) *10. Atopic dermatitis..* J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S475–S480. doi: 10.1016/j.jaci.2005.10.018.
- BOGUNIEWICZ M. und LEUNG D.Y.M. (2011) *Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation..* Immunol Rev **242**(1): 233–246. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01027.x.
- BOSMA G.C., CUSTER R.P. und BOSMA M.J. (1983) *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse..* Nature **301**(5900): 527–530.
- BRAUN-FALCO (1996) *Atopie und atopisches Ekzem.* Dermatologie und Venerologie, volume 4. Springer, Heidelberg. 3-540-12025-8.
- CHAN L.S., ROBINSON N. und XU L. (2001) *Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis..* J Invest Dermatol **117**(4): 977–983. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01484.x.
- CHAN S.C., KIM J.W., HENDERSON W. JR und HANIFIN J.M. (1993) *Altered prostaglandin E2 regulation of cytokine production in atopic dermatitis..* J Immunol **151**(6): 3345–3352.
- CHRISTIANSON S.W., GREINER D.L., SCHWEITZER I.B., GOTT B., BEAMER G.L., SCHWEITZER P.A., HESSELTON R.M. und SHULTZ L.D. (1996) *Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human T-lymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-scid mice and in C57BL/6J-scid bg mice..* Cell Immunol **171**(2): 186–199. doi: 10.1006/cimm.1996.0193.
- CORK M.J., ROBINSON D.A., VASILOPOULOS Y., FERGUSON A., MOUSTAFA M., MACGOWAN A., DUFF G.W., WARD S.J. und TAZI-AHNINI R. (2006) *New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions..* J Allergy Clin Immunol **118**(1): 3–21; quiz 22–3. doi: 10.1016/j.jaci.2006.04.042.
- DESCOTES J. und CHOQUET-KASTYLEVSKY G. (2001) *Gell and Coombs's classification: is it still valid?.* Toxicology **158**(1-2): 43–49.

- EICHENFIELD L.F., HANIFIN J.M., BECK L.A., LEMANSKE R.F. JR, SAMPSON H.A., WEISS S.T. und LEUNG D.Y.M. (2003) *Atopic dermatitis and asthma: parallels in the evolution of treatment..* Pediatrics **111**(3): 608–616.
- ELIAS P.M., HATANO Y. und WILLIAMS M.L. (2008) *Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms.* J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1337–43.
- ELIAS P.M. und STEINHOFF M. (2008) *“Outside-to-inside“ (and now back to “outside“) pathogenic mechanisms in atopic dermatitis.* J Invest Dermatol **128**(5): 1067–70.
- GAJEWSKI T.F., JOYCE J. und FITCH F.W. (1989) *Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma..* J Immunol **143**(1): 15–22.
- GEHA R.S., JABARA H.H. und BRODEUR S.R. (2003) *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination..* Nat Rev Immunol **3**(9): 721–732. doi: 10.1038/nri1181.
- GFESSER M., RAKOSKI J. und RING J. (1996) *The disturbance of epidermal barrier function in atopy patch test reactions in atopic eczema..* Br J Dermatol **135**(4): 560–565.
- GIUSTIZIERI M.L., ALBANESI C., FLUHR J., GISONDI P., NORGAUER J. und GIROLOMONI G. (2004) *H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes..* J Allergy Clin Immunol **114**(5): 1176–1182. doi: 10.1016/j.jaci.2004.07.054.
- GREINER D.L., HESSELTON R.A. und SHULTZ L.D. (1998) *SCID mouse models of human stem cell engraftment..* Stem Cells **16**(3): 166–177. doi: 10.1002/stem.160166.
- GUTZMER R., DIESTEL C., MOMMERT S., KÖTHER B., STARK H., WITTMANN M. und WERFEL T. (2005) *Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells..* J Immunol **174**(9): 5224–5232.

- HACHEM J.P., HOUBEN E., CRUMRINE D., MAN M.Q., SCHURER N., ROELANDT T., CHOI E.H., UCHIDA Y., BROWN B.E., FEINGOLD K.R. und ELIAS P.M. (2006) *Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis..* J Invest Dermatol **126**(9): 2074–2086. doi: 10.1038/sj.jid.5700351.
- HAMID Q., BOGUNIEWICZ M. und LEUNG D.Y. (1994) *Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis..* J Clin Invest **94**(2): 870–876. doi: 10.1172/JCI117408.
- HANIFIN J.M. und RAJKA G. (1980) *Diagnostic Features of Atopic Dermatitis.* Acta Dermatovener (Stockholm) 44–47.
- HANSSON L., BÄCKMAN A., NY A., EDLUND M., EKHOLM E., EKSTRAND HAMMARSTRÖM B., TÖRNELL J., WALLBRANDT P., WENNBO H. und EGELRUD T. (2002) *Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis..* J Invest Dermatol **118**(3): 444–449. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01684.x.
- HESSELTON R.M., GREINER D.L., MORDES J.P., RAJAN T.V., SULLIVAN J.L. und SHULTZ L.D. (1995) *High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice..* J Infect Dis **172**(4): 974–982.
- HOWELL M.D., NOVAK N., BIEBER T., PASTORE S., GIROLOMONI G., BOGUNIEWICZ M., STREIB J., WONG C., GALLO R.L. und LEUNG D.Y.M. (2005) *Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis..* J Invest Dermatol **125**(4): 738–745. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23776.x.
- ITO M., HIRAMATSU H., KOBAYASHI K., SUZUE K., KAWAHATA M., HIOKI K., UYAMA Y., KOYANAGI Y., SUGAMURA K., TSUJI K., HEIKE T. und NAKAHATA T. (2002) *NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells..* Blood **100**(9): 3175–3182. doi: 10.1182/blood-2001-12-0207.
- JUJO K., RENZ H., ABE J., GELFAND E.W. und LEUNG D.Y. (1992) *Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis..* J Allergy Clin Immunol **90**(3 Pt 1): 323–331.

- JUTEL M., WATANABE T., KLUNKER S., AKDIS M., THOMET O.A., MALOLEPSZY J., ZAK-NEJMARK T., KOGA R., KOBAYASHI T., BLASER K. und AKDIS C.A. (2001) *Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors..* Nature **413**(6854): 420–425. doi: 10.1038/35096564.
- KAWAKAMI Y., YUMOTO K. und KAWAKAMI T. (2007) *An improved mouse model of atopic dermatitis and suppression of skin lesions by an inhibitor of Tec family kinases..* Allergol Int **56**(4): 403–409. doi: 10.2332/allergolint.O-07-486.
- KAY J., GAWKRODGER D.J., MORTIMER M.J. und JARON A.G. (1994) *The prevalence of childhood atopic eczema in a general population..* J Am Acad Dermatol **30**(1): 35–39.
- KINACIYAN T., NATTER S., KRAFT D., STINGL G. und VALENTA R. (2002) *IgE autoantibodies monitored in a patient with atopic dermatitis under cyclosporin A treatment reflect tissue damage..* J Allergy Clin Immunol **109**(4): 717–719.
- KING M., PEARSON T., SHULTZ L.D., LEIF J., BOTTINO R., TRUCCO M., ATKINSON M.A., WASSERFALL C., HEROLD K.C., WOODLAND R.T., SCHMIDT M.R., WODA B.A., THOMPSON M.J., ROSSINI A.A. und GREINER D.L. (2008) *A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene.* Clin Immunol **126**(3): 303–14.
- KOEPER L.M., SCHULZ A., AHR H.J. und VOHR H.W. (2007) *In vitro differentiation of skin sensitizers by cell signaling pathways.* Toxicology **242**(1-3): 144–52.
- LAPIDOT T., PFLUMIO F., DOEDENS M., MURDOCH B., WILLIAMS D.E. und DICK J.E. (1992) *Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice..* Science **255**(5048): 1137–1141.
- LAZARUS A.H., CROW A.R., SEMPLE J.W., COSGRAVE D., KALOVSKY E.J., HAN-NACH B., BLANCHETTE V. und FREEDMAN J. (1997) *Induction of a secondary human anti-HLA alloimmune response in severe combined immunodeficient mice engrafted with human lymphocytes..* Transfusion **37**(11-12): 1192–1199.
- LESTER M.R., HOFER M.F., GATELY M., TRUMBLE A. und LEUNG D.Y. (1995) *Down-regulating effects of IL-4 and IL-10 on the IFN-gamma response in atopic*

- dermatitis*.. J Immunol **154**(11): 6174–6181.
- LEUNG D.Y. (1995) *Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases*.. J Allergy Clin Immunol **96**(3): 302–18; quiz 319.
- LEUNG D.Y. (1999) *Pathogenesis of atopic dermatitis*.. J Allergy Clin Immunol **104**(3 Pt 2): S99–108.
- LEUNG D.Y. und SOTER N.A. (2001) *Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis*.. J Am Acad Dermatol **44**(1 Suppl): S1–S12.
- LEUNG D.Y.M. und BIEBER T. (2003) *Atopic dermatitis*.. Lancet **361**(9352): 151–160. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12193-9.
- LEYDEN J.J., MARPLES R.R. und KLIGMAN A.M. (1974) *Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis*.. Br J Dermatol **90**(5): 525–530.
- MAN M.Q., HATANO Y., LEE S.H., MAN M., CHANG S., FEINGOLD K.R., LEUNG D.Y., HOLLERAN W., UCHIDA Y. und ELIAS P.M. (2008) *Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges*. J Invest Dermatol **128**(1): 79–86.
- MATSUDA H., WATANABE N., GEBBA G.P., SPERL J., TSUDZUKI M., HIROI J., MATSUMOTO M., USHIO H., SAITO S., ASKENASE P.W. und RA C. (1997) *Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice*.. Int Immunol **9**(3): 461–466.
- MATSUI K., NISHIKAWA A., SUTO H., TSUBOI R. und OGAWA H. (2000) *Comparative study of Staphylococcus aureus isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis patients*.. Microbiol Immunol **44**(11): 945–947.
- MATSUMOTO K., MIZUKOSHI K., OYOBIKAWA M., OHSHIMA H. und TAGAMI H. (2004) *Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments*.. Skin Res Technol **10**(2): 122–129. doi: 10.1111/j.1600-0846.2004.00062.x.

- MAYER R.J., BOLOGNESE B.J., AL-MAHDI N., COOK R.M., FLAMBERG P.L., HANSBURY M.J., KHANDEKAR S., APPELBAUM E., FALLER A. und MARSHALL L.A. (2000) *Inhibition of CD23 processing correlates with inhibition of IL-4-stimulated IgE production in human PBL and hu-PBL-reconstituted SCID mice.* Clin Exp Allergy **30**(5): 719–27.
- MCCUNE J.M., NAMIKAWA R., KANESHIMA H., SHULTZ L.D., LIEBERMAN M. und WEISSMAN I.L. (1988) *The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function..* Science **241**(4873): 1632–1639.
- MCGIRT L.Y. und BECK L.A. (2006) *Innate immune defects in atopic dermatitis..* J Allergy Clin Immunol **118**(1): 202–208. doi: 10.1016/j.jaci.2006.04.033.
- MOSIER D.E., GULIZIA R.J., BAIRD S.M. und WILSON D.B. (1988) *Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency..* Nature **335**(6187): 256–259. doi: 10.1038/335256a0.
- MOTHES N., NIGGEMANN B., JENNECK C., HAGEMANN T., WEIDINGER S., BIEBER T., VALENTA R. und NOVAK N. (2005) *The cradle of IgE autoreactivity in atopic eczema lies in early infancy..* J Allergy Clin Immunol **116**(3): 706–709. doi: 10.1016/j.jaci.2005.06.025.
- MURATA Y., OGATA J., HIGAKI Y., KAWASHIMA M., YADA Y., HIGUCHI K., TSUCHIYA T., KAWAINAMI S. und IMOKAWA G. (1996) *Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency?.* J Invest Dermatol **106**(6): 1242–1249.
- NEIS M.M., PETERS B., DREUW A., WENZEL J., BIEBER T., MAUCH C., KRIEG T., STANZEL S., HEINRICH P.C., MERK H.F., BOSIO A., BARON J.M. und HERMANN H.M. (2006) *Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis..* J Allergy Clin Immunol **118**(4): 930–937. doi: 10.1016/j.jaci.2006.07.015.
- NELMS K., KEEGAN A.D., ZAMORANO J., RYAN J.J. und PAUL W.E. (1999) *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions..* Annu Rev Immunol **17**: 701–738. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701.

- NICKOLOFF B.J. und NAIDU Y. (1994) *Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin..* J Am Acad Dermatol **30**(4): 535–546.
- NIEBUHR M. und WERFEL T. (2010) *Innate immunity, allergy and atopic dermatitis..* Curr Opin Allergy Clin Immunol **10**(5): 463–468. doi: 10.1097/ACI.0b013e32833e3163.
- NOMURA T., SANDILANDS A., AKIYAMA M., LIAO H., EVANS A.T., SAKAI K., OTA M., SUGIURA H., YAMAMOTO K., SATO H., PALMER C.N.A., SMITH F.J.D., MCLEAN W.H.I. und SHIMIZU H. (2007) *Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis..* J Allergy Clin Immunol **119**(2): 434–440. doi: 10.1016/j.jaci.2006.12.646.
- NOVAK N. und BIEBER T. (2000) *The skin as a target for allergic diseases..* Allergy **55**(2): 103–107.
- NOVAK N. und BIEBER T. (2003) *Allergic and nonallergic forms of atopic diseases..* J Allergy Clin Immunol **112**(2): 252–262.
- NOVAK N., BIEBER T. und KRAFT S. (2004) *Immunoglobulin E-bearing antigen-presenting cells in atopic dermatitis..* Curr Allergy Asthma Rep **4**(4): 263–269.
- NOVAK N., BIEBER T. und LEUNG D.Y.M. (2003) *Immune mechanisms leading to atopic dermatitis..* J Allergy Clin Immunol **112**(6 Suppl): S128–S139. doi: 10.1016/j.jaci.2003.09.032.
- OHBO K., SUDA T., HASHIYAMA M., MANTANI A., IKEBE M., MIYAKAWA K., MORIYAMA M., NAKAMURA M., KATSUKI M., TAKAHASHI K., YAMAMURA K. und SUGAMURA K. (1996) *Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain..* Blood **87**(3): 956–967.
- ONG P.Y., OHTAKE T., BRANDT C., STRICKLAND I., BOGUNIEWICZ M., GANZ T., GALLO R.L. und LEUNG D.Y.M. (2002) *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis..* N Engl J Med **347**(15): 1151–1160. doi: 10.1056/NEJMoa021481.

- ORANJE A.P., GLAZENBURG E.J., WOLKERSTORFER A. und DE WAARD-VAN DER SPEK F.B. (2007) *Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score.* Br J Dermatol **157**(4): 645–648. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08112.x.
- OYOSHI M.K., ELKHAL A., SCOTT J.E., WURBEL M.A., HORNICK J.L., CAMPBELL J.J. und GEHA R.S. (2011) *Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin.* J Clin Invest **121**(6): 2210–2220. doi: 10.1172/JCI43586.
- 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., O'REGAN G.M., WATSON R.M., CECIL J.E., BALE S.J., COMPTON J.G., DIGIOVANNA J.J., FLECKMAN P., LEWIS-JONES S., ARSECULERATNE G., SERGEANT A., MUNRO C.S., EL HOUATE B., MCELREAVEY K., HALKJAER L.B., BISGAARD H., MUKHOPADHYAY S. und MCLEAN W.H.I. (2006) *Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis.* Nat Genet **38**(4): 441–446. doi: 10.1038/ng1767.
- RING J., DARSOW U. und BEHRENDT H. (2001) *Role of aeroallergens in atopic eczema: proof of concept with the atopy patch test.* J Am Acad Dermatol **45**(1 Suppl): S49–S52.
- RING J., DARSOW U., GFESSER M. und VIELUF D. (1997) *The 'atopy patch test' in evaluating the role of aeroallergens in atopic eczema.* Int Arch Allergy Immunol **113**(1-3): 379–383.
- RODRIGUEZ E., BAURECHT H., HERBERICH E., WAGENPFEIL S., BROWN S.J., CORDELL H.J., IRVINE A.D. und WEIDINGER S. (2009) *Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease.* J Allergy Clin Immunol **123**(6): 1361–70.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2009.03.036.
- SANDILANDS A., SUTHERLAND C., IRVINE A.D. und MCLEAN W.H.I. (2009) *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease.* J Cell Sci **122**(Pt 9): 1285–1294. doi: 10.1242/jcs.033969.
- SANTINI S.M., SPADA M., PARLATO S., LOGOZZI M., LAPENTA C., PROIETTI E., BELARDELLI F. und FAIS S. (1998) *Treatment of severe combined immunodeficiency*

- mice with anti-murine granulocyte monoclonal antibody improves human leukocyte xenotransplantation.. Transplantation* **65**(3): 416–420.
- SCHMITZ N. und BARRETT J. (2002) *Optimizing engraftment–source and dose of stem cells.. Semin Hematol* **39**(1): 3–14.
- SHIBATA S., ASANO T., NOGUCHI A., NAITO M., OGURA A. und DOI K. (1998) *Peritoneal macrophages play an important role in eliminating human cells from severe combined immunodeficient mice transplanted with human peripheral blood lymphocytes.. Immunology* **93**(4): 524–532.
- SHULTZ L.D., ISHIKAWA F. und GREINER D.L. (2007) *Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol* **7**(2): 118–30.
- SHULTZ L.D., LYONS B.L., BURZENSKI L.M., GOTT B., CHEN X., CHALEFF S., KOTB M., GILLIES S.D., KING M., MANGADA J., GREINER D.L. und HANDGRETINGER R. (2005) *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.. J Immunol* **174**(10): 6477–6489.
- SHULTZ L.D., SCHWEITZER P.A., CHRISTIANSON S.W., GOTT B., SCHWEITZER I.B., TENNENT B., MCKENNA S., MOBRAATEN L., RAJAN T.V. und GREINER D.L. (1995) *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice.. J Immunol* **154**(1): 180–191.
- SPERGEL J.M. (2005) *Atopic march: link to upper airways.. Curr Opin Allergy Clin Immunol* **5**(1): 17–21.
- SPERGEL J.M. (2010) *From atopic dermatitis to asthma: the atopic march.. Ann Allergy Asthma Immunol* **105**(2): 99–106; quiz 107–9, 117. doi: 10.1016/j.anai.2009.10.002.
- SPERGEL J.M. und PALLER A.S. (2003) *Atopic dermatitis and the atopic march.. J Allergy Clin Immunol* **112**(6 Suppl): S118–S127. doi: 10.1016/j.jaci.2003.09.033.
- SPIEGELBERG H.L., BECK L., KOCHER H.P., FANSLOW W.C. und LUCAS A.H. (1994) *Role of interleukin-4 in human immunoglobulin E formation in hu-PBL-SCID mice. J Clin Invest* **93**(2): 711–7.

- SPRECHER E., CHAVANAS S., DIGIOVANNA J.J., AMIN S., NIELSEN K., PRENDIVILLE J.S., SILVERMAN R., ESTERLY N.B., SPRAKER M.K., GUELG E., DE LUNA M.L., WILLIAMS M.L., BUEHLER B., SIEGFRIED E.C., VAN MALDERGEM L., PFENDNER E., BALE S.J., UITTO J., HOVNANIAN A. und RICHARD G. (2001) *The spectrum of pathogenic mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis..* J Invest Dermatol **117**(2): 179–187. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01389.x.
- STRINGL G. H. FRITSCH P (2004) Atopische Dermatitis (syn. Atopisches Ekzem, endogenes Ekzem, Neurodermitis constitutionalis). Dermatologie und Venerologie. Springer, Berlin-Heidelberg.
- SUGAMURA K., ASAO H., KONDO M., TANAKA N., ISHII N., OHBO K., NAKAMURA M. und TAKESHITA T. (1996) *The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID..* Annu Rev Immunol **14**: 179–205. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.179.
- VALENTA R., MAURER D., STEINER R., SEIBERLER S., SPERR W.R., VALENT P., SPITZAUER S., KAPIOTIS S., SMOLEN J. und STINGL G. (1996) *Immunoglobulin E response to human proteins in atopic patients..* J Invest Dermatol **107**(2): 203–208.
- VAN DEN OORD R.A.H.M. und SHEIKH A. (2009) *Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis..* BMJ **339**: b2433.
- WERFEL T. (2009) *The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis..* J Invest Dermatol **129**(8): 1878–1891. doi: 10.1038/jid.2009.71.
- WOLF R. und WOLF D. (2012) *Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis..* Clin Dermatol **30**(3): 329–334. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.023.
- WU K., HIGASHI N., HANSEN E.R., LUND M., BANG K. und THESTRUP-PEDERSEN K. (2000) *Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis..* J Immunol **165**(8): 4742–4747.
- ZHENG T., YU J., OH M.H. und ZHU Z. (2011) *The atopic march: progression from*

atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma.. Allergy Asthma Immunol Res **3**(2):
67–73. doi: 10.4168/aair.2011.3.2.67.

Danksagung

Ich danke den Tieren:

Sie erbrachten das größte Opfer.

Des Weiteren möchte ich ganz besonders meinen großartigen Betreuern und Kollegen danken, insbesondere Roswitha, ohne euch hätte ich das nie geschafft!