

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

München

Entwicklung und Validierung eines Modells für atopische
Dermatitis in NOD Scid IL2R γ Chain^{null} Mäusen mit humanisiertem
Immunsystem

von Marietta Seuß

aus Münchberg

München 2021

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

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des
Klinikums der Universität München am Campus Innenstadt

Mentorin: Dr. Roswitha Gropp

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

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

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Atopische Dermatitis	3
2.1.1	Definition	3
2.1.2	Epidemiologie.....	3
2.1.3	Ätiologie und Pathogenese	4
2.1.4	Klinische Symptome.....	7
2.1.5	Diagnose	8
2.1.6	Prävention und Therapie.....	11
2.2	Immunologische Aspekte der atopischen Dermatitis	13
2.2.1	Angeborenes Immunsystem.....	13
2.2.2	Erworbenes Immunsystem.....	17
2.2.3	Entzündungskaskade bei atopischer Dermatitis.....	18
2.3	Tiermodelle für atopische Dermatitis	19
2.3.1	Induzierte atopische Dermatitis durch kutane Applikation von Allergenen oder Chemikalien.....	20
2.3.2	Transgene Mäuse mit Über- oder Unterexpression	20
2.3.3	Spontane Entwicklung einer atopischen Dermatitis	21
2.4	NOD.cg-Prkdc ^{SCID} Il2rg ^{tm1Wjl} /Szj Mäuse	21
3	Zielsetzung.....	23
4	Material und Methoden.....	25
4.1	Rekrutierung und Auswahl der Spenderinnen und Spender	25
4.2	Versuchstiere.....	25
4.3	PBMC Isolierung	25
4.4	Rekonstitution.....	26
4.4.1	Tierzahlen und Versuchsgruppen	26
4.4.2	Versuchsablauf.....	27

4.4.3	Herstellung und Applikation von Methylcellulosegel bzw. Prednisolon	28
4.4.4	Klinischer Score.....	29
4.4.5	Makroskopischer Hautscore.....	32
4.4.6	Versuchsende	33
4.5	Analysen nach dem Versuchsende.....	34
4.5.1	FACS Analyse Versuchsende.....	34
4.5.2	Histologie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
4.5.3	Histologischer Score	39
4.5.4	Luminex	40
4.5.5	Immunprofilierung.....	42
4.5.6	Statistik	42
5	Ergebnisse.....	45
5.1	Auswertung der Spenderinnen und des Spenders.....	45
5.2	Immunprofilierung.....	46
5.3	Rekonstitutionsgrad	51
5.4	Entwicklung des Modells.....	52
5.4.1	Klinischer Score.....	52
5.4.2	Makroskopischer Hautscore.....	54
5.4.3	Histologischer Score	55
5.4.4	Immunologisches Bild	58
5.5	Effekte durch Prednisolon.....	65
5.5.1	Klinischer Score.....	65
5.5.2	Makroskopischer Hautscore.....	66
5.5.3	Histologischer Score	67
5.5.4	Immunologisches Bild	69
6	Diskussion.....	77
6.1	Ziele	77
6.1.1	Immunprofilierung der Spenderinnen und Spender.....	77

6.1.2	Rekonstitutionsgrad	77
6.1.3	Entwicklung eines Tiermodells für atopische Dermatitis	78
6.1.4	Charakterisierung der immunologischen Vorgänge	79
6.1.5	Effekte durch Prednisolon.....	82
6.2	Vor- und Nachteile des Modells	85
6.3	Ausblick	86
7	Zusammenfassung.....	87
8	Summary	89
9	Literaturverzeichnis	91
10	Anhang.....	107
10.1	FACS Gatingstrategie	107
10.1.1	FACS Gatingstrategie PBMC	107
10.1.2	FACS Gatingstrategie Milz.....	112
10.2	FACS Antikörper	116
10.3	Marker zur Bestimmung der Immunzellen	118
10.4	Patientenfragebogen mit SCORAD Schema	120
10.6	Tabellen zur statistischen Auswertung	123
10.7	R-Skripte	133
10.8	Abbildungsverzeichnis.....	139
10.9	Tabellenverzeichnis	142
11	Danksagung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
APC	Allophycocyanin
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
CASP1	Caspase-1
Cat E	Cathepsin E
CCR	CC-Chemokine Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cy5.5 bzw. Cy7	Cyaninfarbstoffe bei Tandemkonjugaten
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FLG	<i>Filaggrin</i>
GVHD	<i>Graft-versus-host-disease</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-3	<i>Monocyte chemotactic protein 3</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NOD Scid IL2R γ Chain ^{null} Mäuse	NOD.cg-Prkdc ^{SCID} Il2rg ^{tm1Wjl} /Szj Mäuse

oPLS-DA	<i>Orthogonal partial least squares discriminant analysis</i>
p	Signifikanzwert
PBMC	Mononukleäre Zellen des Blutes (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
Prkdc ^{scid}	<i>Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide, severe combined immunodeficiency</i>
Q2Y	Schätzung der Qualität der Vorhersage durch <i>cross-validation</i>
R2X (cum)	(Kumulierte) prädiktive und orthogonale Variation in X, die vom Modell erklärt wird
R2Y (cum)	(Kumulierte) Variation in Y, die vom Modell erklärt wird
RMSEE	<i>Root mean squared error of estimation</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SCORAD	SCORing AD
spp.	Spezies
s.c.	subcutan
Th-Zellen	T-Helferzellen
TIS	<i>Three-item severity Score</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TSLPR	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> Rezeptor
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Atopische Dermatitis (AD) gilt als häufig auftretende chronisch inflammatorische Hautkrankheit und ist gekennzeichnet durch rote, schuppige, nässende Ekzeme sowie starken Juckreiz (Bieber, 2008; Boguniewicz & Leung, 2011; Eichenfield et al., 2014). Der Begriff der Atopie beschreibt nach Pschyrembel (2011) eine „Polygen vererbte genetische Prädisposition für verschiedene klinische Manifestationen der Überempfindlichkeitsreaktion [...] vom Soforttyp (Typ I der Allergie [...])“. Von AD betroffen sind weltweit 15-20% der Kinder (Asher et al., 2006) und 1-3% der Erwachsenen (Nuttgen, 2015). Zur Behandlung werden neben hydratisierenden Cremes (Katsarou & Armenaka, 2011) vor allem Therapien mit immunsuppressiver Wirkung (Ring et al., 2012) und monoklonale Antikörper (Cork et al., 2020) eingesetzt. Letztere verursachen jedoch bei langjähriger Anwendung starke Nebenwirkungen (Aranez & Ambrus, 2020).

Mit einem tieferen Verständnis der Pathogenese können besser verträgliche und gezielter wirkende Therapeutika für eine individualisierte Therapie entwickelt werden. Dafür werden derzeit Tiermodelle genutzt, die zwar gute Erkenntnisse liefern, allerdings häufig nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Daher ist die Entwicklung und Validierung eines Mausmodells mit humanisiertem Immunsystem eine wünschenswerte Alternative als Plattform zur Entwicklung neuer Medikamente. Durch ein solches Modell, welches das Immunsystem des jeweiligen Patienten widerspiegeln kann, sowie den Einsatz von mononukleären Zellen des Blutes (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) als therapeutisches Ziel, wird eine bessere Übertragbarkeit auf das humane Organsystem und damit langfristig eine personalisierte Medizin ermöglicht (Jodeleit et al., 2019).

2 Literaturübersicht

Es folgt eine Übersicht zum aktuellen Stand der Forschung.

2.1 Atopische Dermatitis

Synonyme für AD sind Neurodermitis, atopisches Ekzem oder endogenes Ekzem (Schmid-Grendelmeier et al., 2001).

2.1.1 Definition

AD ist eine chronisch-rezidivierende inflammatorische Hauterkrankung (Berke et al., 2012; Drucker et al., 2017).

Man unterscheidet zwischen einer extrinsischen und einer intrinsischen Form der AD (Wollenberg et al., 2000) anhand der Höhe der Immunglobulin E (IgE)-Werte im Blutserum (Mori et al., 2010). Bei der intrinsischen Form werden keine erhöhten Serum-IgE-Spiegel gemessen, das heißt, die Werte liegen unter 150-200 kU/l (Schmid-Grendelmeier et al., 2001). Mit 80% (Tokura, 2010) kommt die extrinsische Form, die charakterisiert ist durch allergenbedingte IgE-vermittelte Antigenreaktionen (Barnetson et al., 1989), jedoch deutlich häufiger vor.

2.1.2 Epidemiologie

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, hat AD eine hohe Prävalenz und die Anzahl der erkrankten Personen erhöhte sich in den letzten Jahrzehnten um das 2- bis 3-fache (Nutten, 2015). Regional gibt es jedoch starke Unterschiede; so liegt die Prävalenz bei Kindern im Alter von 6 bis 7 Jahren zwischen 0,9% in Indien und 22,5% in Ecuador, mit steigenden Tendenzen in Asien und Lateinamerika. In der Altersgruppe der 13- bis 14-Jährigen findet sich die höchste Prävalenz in Lateinamerika und Afrika. Die Werte schwanken weltweit zwischen 0,2% in China und 24,6% in Kolumbien. Insgesamt sind Mädchen häufiger betroffen als Jungen. (Odhiambo et al., 2009)

Bei 45% der Patientinnen und Patienten beginnt die Krankheit bereits im Alter von bis zu 6 Monaten, bei 60% im Alter von bis zu einem Jahr und bei 85% im Alter von bis zu 5 Jahren (Kay et al., 1994; Spergel, 2005). Häufig besteht die Krankheit bis ins Erwachsenenalter fort oder tritt dann sogar erstmals auf (Margolis et al., 2014).

Patientinnen und Patienten mit AD haben außerdem ein erhöhtes Risiko, an Allergien und Asthma zu erkranken. Bis zu 70% aller an AD erkrankten Personen entwickeln im Laufe ihres Lebens Asthma bronchiale, verglichen mit etwa 8% der Allgemeinbevölkerung (Zheng et al., 2011). Dieses Phänomen wird in der Literatur auch als *Atopic march* bezeichnet (Spergel, 2010; Spergel & Paller, 2003).

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Das klinische Bild der AD ist in seiner Ausprägung, Dynamik und Komorbidität sehr heterogen, was an den unterschiedlichen pathogenetischen Aspekten liegen kann, die zum Ausbruch der Krankheit führen (Scheerer & Eyerich, 2018). Ob Veränderungen in der Hautbarriere immunologische Dysregulationen bedingen (*Outside-In* Hypothese) oder ob umgekehrt immunologische Dysregulationen Veränderungen in der Hautbarriere bedingen (*Inside-Out* Hypothese), bleibt bisher strittig (Boguniewicz & Leung, 2011; Elias et al., 2008; Elias & Steinhoff, 2008).

2.1.3.1 Genetische Prädisposition

Bereits Larsen et al. (1986) und Coleman et al. (1997) gewinnen durch Verwandtschaftsstudien die Erkenntnis, dass genetische Faktoren einen großen Einfluss haben.

Die bedeutendste Rolle spielt hierbei die *Loss-of-function*-Mutation des Filaggrin(*FLG*, *filament aggregating protein*)-Gens; etwa ein Drittel der europäisch-kaukasischen Patientinnen und Patienten weist die *FLG*-Null-Mutationen R501X und 2282del4 auf (Palmer et al., 2006; Rodriguez et al., 2009). *FLG* ist ein Strukturprotein in der Epidermis, das v.a. im Stratum corneum zur Aggregation von intermediären Filamenten und dadurch zur Barrierebildung beiträgt (Sandilands et al., 2009). Durch ein Fehlen des *FLG* und einen Funktionsverlust des Strukturproteins kommt es zu vermehrtem transdermalen Wasserverlust. Außerdem kann es zu einer vermehrten Besiedelung von *Staphylococcus (S.) aureus* und zum Eindringen von Allergenen kommen, wodurch höhere IgE-Werte gemessen werden (Irvine et al., 2011). Zusätzlich kann *FLG* auch direkt Allergene beeinflussen: es kann zur Inaktivierung der Phospholipase von Hausstaubmilben führen, was eine verminderte Antigenpräsentation von *Cluster of differentiation (CD)1a*-aktiven T-Zellen bedingt. Auch dadurch kommt es zu einer erhöhten Infiltration von Entzündungszellen nach einer Allergenexposition (Jarrett

et al., 2016). Des Weiteren können die Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-13 und IL-31 die Expression des FLG verringern und dadurch ebenfalls zu einer gestörten Hautbarrierefunktion beitragen (Szegedi et al., 2012).

Auch verschiedene andere immunologische Genloci werden als Einflussfaktoren diskutiert (Wollenberg et al., 2000). Eine immunologische Ähnlichkeit zu Rhinokonjunktivitis allergica und Asthma bronchiale liegt dabei vor (Ferreira et al., 2017).

2.1.3.2 *Dysregulation der T-Helferzellen (Th1/Th2)-Immunantwort*

AD Patientinnen und Patienten weisen ein Ungleichgewicht zugunsten von Th2-Zellen auf (Wollenberg et al., 2000), weshalb folgende immunologische Auffälligkeiten nachgewiesen werden können (Novak & Bieber, 2005):

- Periphere Eosinophilie
- Erhöhte Serum-IgE-Spiegel
- Vermehrte IL-4, IL-5 und IL-13 produzierende T-Zellen

Mit fortschreitender chronischer Erkrankung findet jedoch ein *Switch* von der im akuten Stadium vorherrschenden Th2-dominierten zu einer Th1-dominierten Immunantwort statt (Leung et al., 2004a). Dieser *Switch* wird vermutlich initiiert mithilfe der Produktion von IL-12 durch infiltrierende Eosinophile und inflammatorische dendritische Zellen (Novak et al., 2003).

2.1.3.3 *Gestörte epidermale Barriere*

Als wesentliche Ursache der Krankheitsentstehung gilt eine gestörte Hautbarriere (Boguniewicz & Leung, 2011; Cork et al., 2006), wodurch die Abwehrfunktion gegenüber Umwelt und Infektionserregern nicht mehr gegeben ist (Geoghegan et al., 2018; Scheerer & Eyerich, 2018).

Es kommt zu einem transdermalen Wasserverlust und damit einerseits zu einer erhöhten Trockenheit der Haut und andererseits zu einem vereinfachten Eindringen von sensibilisierenden oder toxischen Substanzen (Jungersted et al., 2010; Voegeli et al., 2009):

AD Patientinnen und Patienten haben im Vergleich zu nicht-atopischen Personen eine andere Zusammensetzung der Lipide im Stratum corneum. Der Anteil an

Ceramiden ist geringer, wobei die Anzahl kurzkettiger Ceramide erhöht ist. (Ishikawa et al., 2010; Jungersted et al., 2010)

Des Weiteren liegt eine vermehrte Aktivität von Serinproteasen in den unteren Schichten des Stratum corneums vor; betroffen sind tryptaseähnliche Enzyme, Plasmin, Urokinase und Leukozyten-Elastase (Voegeli et al., 2009).

2.1.3.4 Mikrobiom

Ein physiologisches Hautmikrobiom ist wichtig für die Erhaltung des Immunsystems und zur Verhinderung der Ansiedelung von Pathogenen wie *S.aureus* (M. R. Williams & Gallo, 2015).

Nach A. S. L. Tay et al. (2020) ist das Hautmikrobiom von AD Patientinnen und Patienten gekennzeichnet durch die Abwesenheit von *Cutibacterium acnes*, *Dermacoccus* und *Methylobacterium* Spezies (*spp.*) bei einem individuell verschiedenen Auftreten von *Staphylococcus spp.* (z.B. *S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.aureus*). *S.aureus* kann bei 90% aller an AD erkrankten Personen nachgewiesen werden (Leyden et al., 1974). Eine Studie von Totté et al. (2016) zeigt bei AD Patientinnen und Patienten eine *S.aureus*-Prävalenz von 70% auf Läsionen, 39% dagegen auf Stellen ohne Läsionen und bei nicht-atopischer Haut.

S.aureus trägt durch eine Reihe von Virulenzfaktoren zur Pathogenese von Infektionen bei (Geoghegan et al., 2018). Einige davon spielen ebenfalls in der Pathogenese von AD eine Rolle. Beispiele sind Lipoproteine, die proinflammatorisch wirken und Toll-like Rezeptor 2 auf Keratinozyten aktivieren (Nakagawa et al., 2017; Nguyen & Götz, 2016) oder α -Toxin, was zur Membranschädigung und zur Keratinozytolyse führt (Brauweiler et al., 2013; Brauweiler et al., 2014; Breuer et al., 2005).

Zusätzlich exprimiert *S.aureus* Superantigene, die einerseits Allergene darstellen und damit eine IgE-Antwort provozieren (Herz et al., 1998), andererseits an Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und T-Zell-Rezeptoren auf T-Zellen binden. Dies führt zu einer gesteigerten Produktion von toxischen T-Zell-Zytokinen (Arad et al., 2011).

2.1.3.5 *Exogene Trigger und Umweltfaktoren*

Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung, hormonelle Veränderungen und Stress (E. H. Kim et al., 2015; Morren et al., 1994) können den Ausbruch einer AD begünstigen. Eine bestehende Krankheit kann durch barriereschädigende physikalische Faktoren wie häufiges heißes Baden verschlimmert werden (Langan & Irvine, 2013; Scheerer & Eyerich, 2018).

Ebenfalls spielt die Ernährung eine entscheidende Rolle: bei sensibilisierten Säuglingen und Kindern können Lebensmittelallergene wie Milch, Ei, Weizen, Soja und Erdnuss nicht nur Typ-1-allergische Reaktionen, sondern auch Ekzeme hervorrufen (Heratizadeh et al., 2011). Bei Erwachsenen können teilweise auch Aeroallergene wie Pollen oder Hausstaubmilben als Triggerfaktoren wirken (Heratizadeh et al., 2011; Werfel et al., 2015).

2.1.4 Klinische Symptome

Die Symptome einer AD variieren sehr stark je nach Alter der betroffenen Patientinnen und Patienten sowie Chronizität der Erkrankung (Eichenfield et al., 2014). Grundsätzlich kann Juckreiz als Hauptsymptom angesehen werden (Beltrani & Boguniewicz, 2003); ebenfalls häufig kommen chronische oder rezidivierende Ekzeme vor (Leung et al., 2004b).

Bei Säuglingen und Kleinkindern sind meist Gesicht, Hals und Extremitäten betroffen; bei älteren Kindern und Erwachsenen vor allem die Beugen der Extremitäten (Leung et al., 2004b).

In akuten Stadien herrschen Juckreiz, Papeln und erythematöse Haut, umfangreiche Exkorationen (= „Tiefer, bis zur Dermis reichender Gewebedefekt mit Blutung aus freigelegten Blutkapillaren [...]“, (Pschyrembel, 2011)), Erosionen und seröse Exsudate vor, wogegen subakute Stadien begleitet sind von erythematösen, exkoriativen und schälenden Papeln. Chronische AD zeichnet sich aus durch Hautverdickung, Lichenifikation (= „Verdickung von Hautarealen mit lederartiger Vergrößerung der Hautfelderung, verminderter Elastizität und vertieften Hautfurchen [...]“, (Pschyrembel, 2011)) und fibrotische Papeln (Eichenfield et al., 2014; Leung & Soter, 2001).

2.1.5 Diagnose

Die Diagnose wird rein klinisch gestellt, anhand der Anamnese, Morphologie und Verteilung der Hautläsionen sowie klinischer Anzeichen (Eichenfield et al., 2014). Bereits in den 1980er Jahren werden diagnostische Kriterien für AD etabliert, die heute noch angewandt werden. Nach Hanifin (1980) erfordert eine eindeutige Diagnose einer AD mindestens 3 der folgenden Hauptsymptome (siehe Abbildung 1):

- Juckreiz als zwingendes Leitsymptom
- Typische Morphologie und Lokalisation: bei Erwachsenen Lichenifikation oder vergrößerte Hautfalten in den Beugen; bei Kindern Beteiligung des Gesichts und der Streckseiten
- Chronischer oder chronisch-rezidivierender Verlauf, bis zu wöchentlichem Auftreten
- Positive Eigen- (50% der Patientinnen und Patienten) oder Familienanamnese (70% der Betroffenen) für Atopie (Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, AD)

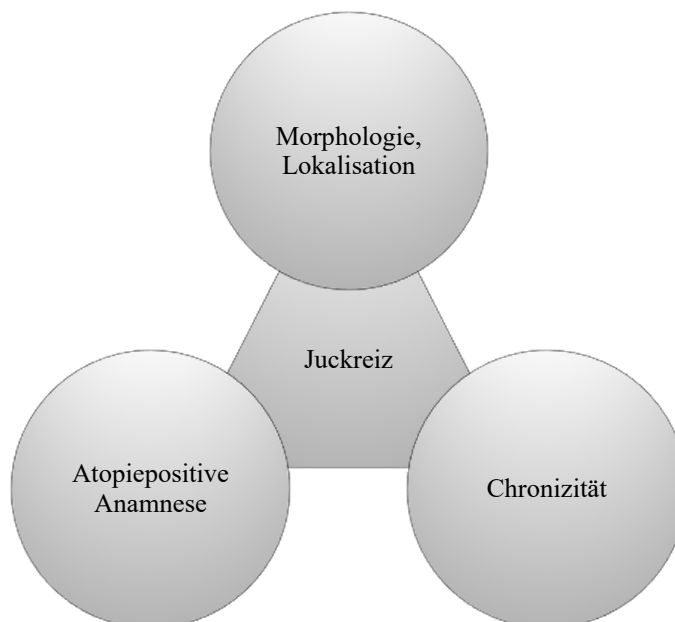


Abbildung 1: Hauptsymptome der AD

Und zusätzlich mindestens 3 der folgenden Begleitsymptome:

- Xerodermie (= „Durch geringen Körperflüssigkeitshaushalt (Dehydratation) und verminderte Talgproduktion (Sebostase)

hervorgerufene Hauttrockenheit, die sich in einer verminderten Hautspannung (Turgor) äußert. Die Haut ist schlaff, spröde, rau, rissig und schuppt. [...]“ (Pschyrembel, 2011))

- Ichthyose (= „Heterogene Gruppe von Genodermatosen mit universeller Xerosis cutis, Hyperkeratose und Schuppung. Unterschiedliche Genmutationen verursachen molekulare Defekte in epidermalen Keratinen oder Lipiden, sowie Enzym- oder Regulationsstörungen mit Verhornungsstörung der Epidermis. [...]“, (Pschyrembel, 2011)), palmare Hyperlinearität, Keratosis pilaris (= „Harmlose Verhornungsstörung der Haarfollikel mit derben Knötchen [...]“, (Pschyrembel, 2011))
- Positive Reaktion auf Hauttests vom Soforttyp (Typ I, 80% der Patientinnen und Patienten)
- Erhöhung des Serum-IgE Spiegels
- Früher Erkrankungsbeginn
- Neigung zu Hautinfektionen (insbes. *S.aureus* und *Herpes simplex*), Störung der zellvermittelten Immunität
- Neigung zu unspezifischem Hand- oder Fußekzem, Mamillenekzem
- Cheilitis (= „Lippenentzündung unterschiedlicher Genese [...]“, (Pschyrembel, 2011))
- Rezidivierende Konjunktivitis, Keratokonus (= „Schubweise fortschreitende kegelförmige Vorwölbung der Hornhaut mit Verdünnung des Parenchyms. Bei Einreißen der Descemet-Membran kommt es zu akuter Quellung des Hornhautstromas mit plötzlichem Visusverlust. [...]“, (Pschyrembel, 2011)), Cataracta subcapsularis anterior
- Horizontale Halsfalten, infraorbitale Dennie-Morgan-Falte (= „Doppelte Unterliedfalte, als atopisches Stigma besonders häufig bei atopischem Ekzem.“, (Pschyrembel, 2011), vorkommend bei 70% der Patientinnen und Patienten), halonierte Augen (= „Schatten um und vor allem unter den Augen. [...]“, (Pschyrembel, 2011))
- Gesichtsblassheit, Gesichtsrötung
- Pityriasis alba (= „Rundliche hypopigmentierte Hautareale mit Schuppung insbesondere im Wangenbereich bei Kindern durch eine leichte Entzündungsreaktion der Haut mit nachfolgend temporär verminderter Größe und Zahl der Melanosomen. [...]“, (Pschyrembel, 2011))

- Juckreiz durch Schwitzen
- Woll-, Lipidlösungsmittel-, Nahrungsmittelunverträglichkeit (bspw. Eier, Fisch), Beeinflussung durch Umwelt- und psychische Faktoren
- Perifollikuläre Akzentuierung
- Weißer Demographismus, *Delayed blanch* Phänomen (= verzögerte Weißreaktion nach Acetylcholin-Injektion)

Eichenfield et al. (2003) vereinfachen diesen Katalog an Symptomen und merken an, dass zusätzlich folgende Krankheiten auszuschließen sind: Scabies, seborrhoisches Ekzem, allergische Kontaktdermatitis, Ichthyose, kutanes Lymphom, Psoriasis und Immunschwächekrankheiten.

Um den Schweregrad der AD zu beurteilen, verwendet die European Task Force on Atopic Dermatitis (1993) den SCORAD (SCORing AD) Index. Es wird die Ausdehnung der Hautveränderungen (A) bewertet (insgesamt 0 bis 100 Punkte). Außerdem wird die Intensität (B) der Symptome Erythem, Ödem/ Papeln, Exkorationen, Lichenifikation, Nässen/ Krustung und Trockenheit auf einer Skala von 0 bis 3 erfasst (insgesamt 0 bis 18 Punkte). Dazu kommen die subjektiven Symptome (C) Juckreiz und Schlaflosigkeit auf einer Skala von 0 bis 10 (insgesamt 0 bis 20 Punkte). Der SCORAD wird nach folgender Formel berechnet:

$$SCORAD = A \div 5 + 7 \times B \div 2 + C$$

A = Ausdehnung der Hautveränderungen; B = Intensität der Hautveränderungen; C = Intensität der subjektiven Symptome

Der maximale SCORAD beträgt 103 Punkte. Obwohl das System ursprünglich für Kinder entwickelt wird, findet es dennoch auch Anwendung in der Diagnostik von Erwachsenen. Allerdings ist es kompliziert, zeitaufwändig in der Durchführung und stellt eine Kombination objektiver und subjektiver Daten dar. Das Endergebnis ist somit stark von den unzuverlässigen und divergierenden Abstufungen der subjektiven Einschätzungen des Betroffenen oder dessen Eltern (Oranje et al., 2007) beeinflusst. Um dies zu verbessern, wird ein objektiver Score angewandt, der auf die subjektiven Einschätzungen von Juckreiz und Schlaflosigkeit verzichtet und somit einen maximalen Wert von 0 bis 83 Punkten aufweisen kann (Kunz et al., 1997). Des Weiteren wird der *Three-item severity score (TIS)* (Wolkerstorfer et al.,

1999), welcher die Intensität von Erythem, Ödem und Exkoriationen an der am meisten betroffenen Läsion beurteilt, eingesetzt. Der *TIS* Score kann mit einer schnellen Bewertung einen Wert von 0 bis 9 erreichen. Jedes dieser Systeme erlaubt eine Einstufung der Krankheit, jedoch ist das Ausmaß von Rötungen nicht bei jeder Hautfarbe deutlich zu erkennen (Oranje et al., 2007).

2.1.6 Prävention und Therapie

In erster Linie soll einer Erkrankung durch ausbleibende Allergietests bei Geburt, Verhinderung einer Ausprägung in der Kindheit, Abmilderung schwerer Verläufe und Prophylaxe anderer atopischer Krankheiten wie Asthma bronchiale vorgebeugt werden (H. C. Williams, 2005).

Bei Manifestation einer AD sind die Ziele nach der Diagnosestellung eine Linderung der Symptome und eine Vermeidung bzw. Verminderung der Hautinfektion. Alle Patientinnen und Patienten benötigen eine Feuchtigkeitspflege der Haut (Katsarou & Armenaka, 2011) und mögliche Triggerfaktoren wie Irritantien, Allergene und emotionaler Stress sollen identifiziert und eliminiert werden (Leung et al., 2004b).

Die Therapieoptionen bei AD beinhalten nach Werfel et al. (2009) die folgenden sowohl medikamentösen als auch nichtmedikamentösen Verfahren:

Nichtmedikamentöse Therapie:

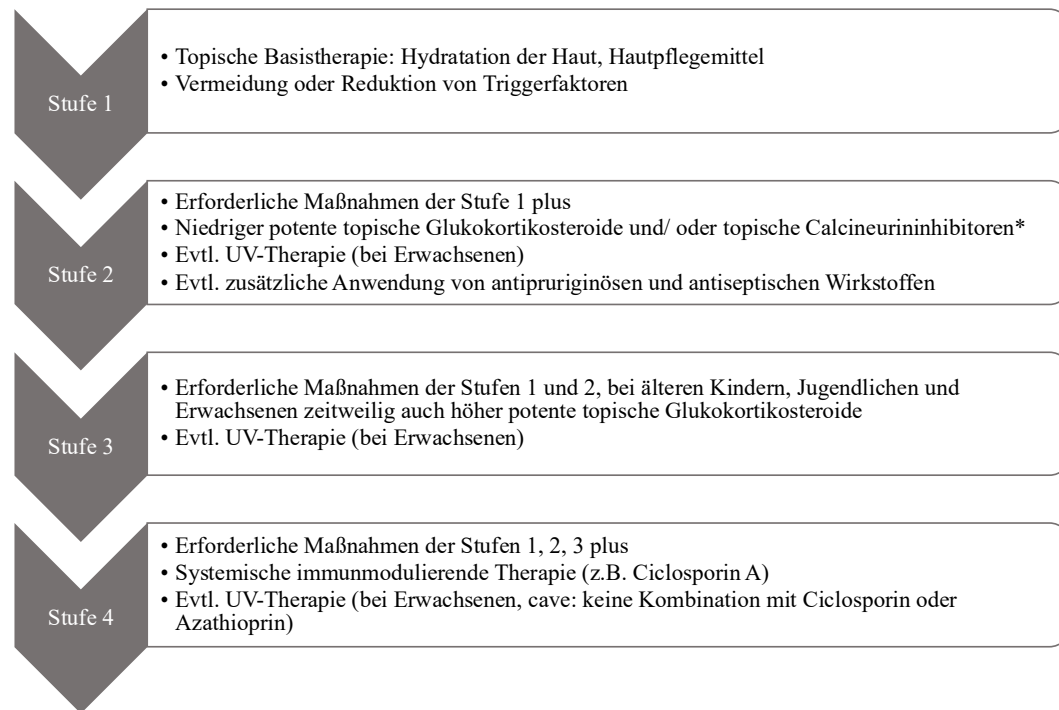
- Neurodermitisschulung
- Eliminationsdiäten
- Essentielle Fettsäuren
- Hausstaubmilbenreduktion

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
- Methotrexat
- Interferone
- Anti-IgE
- Laktobazillen
- Phototherapie

Diese Möglichkeiten sollen, je nach Schwere der Erkrankung und Alter des Betroffenen, nach einem in Abbildung 2 dargestellten Stufenschema angewandt werden, wobei auch eine Kombination verschiedener topischer Mittel inzidiert sein kann (Akdis et al., 2006).



* *First-line-Therapie: In der Regel topische Glukokortikosteroide, bei Unverträglichkeit/ Nichtwirksamkeit und an besonderen Lokalisationen (Gesicht, Intertrigines) topische Calcineurininhibitoren; UV = Ultraviolett.*

Abbildung 2: Vereinfacht dargestellte Stufentherapie zur Behandlung der AD nach Akdis et al. (2006)

Zusätzlich wurde mittlerweile der monoklonale Antikörper Dupilumab zugelassen. Dieser stellt auch eine gute Therapieoption ohne schwere Nebenwirkungen bei mittlerer bis schwerer AD dar. Allerdings bleibt bislang einerseits unklar, bei welcher genauen Indikation er eingesetzt werden sollte und andererseits ist die Sicherheit bei Langzeitanwendung noch nicht abschließend geklärt; zudem sind die Behandlungskosten sehr hoch. (Igawa, 2019)

2.2 Immunologische Aspekte der atopischen Dermatitis

Das Immunsystem des Menschen kann unterteilt werden in das angeborene und das erworbene Immunsystem. Beide arbeiten gemeinsam an der Bekämpfung von Pathogenen (Delves & Roitt, 2000).

2.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert zu jeder Zeit im selben Ausmaß auf Pathogene. Dabei macht es keinen Unterschied, wie oft das angeborene Immunsystem mit einem bestimmten Antigen konfrontiert wird. Zum angeborenen Immunsystem gehören phagozytotische Zellen (Neutrophile, Monozyten,

Makrophagen), Zellen, die Entzündungsmediatoren freisetzen (Basophile, Mastzellen, Eosinophile) und Natürliche Killer-(NK-)Zellen. Des Weiteren beinhaltet es das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und Zytokine. Zusätzlich sind auch physikalischen Barrieremethoden wie die Epidermis oder Mukus in den Atemwegen bzw. dem Gastrointestinaltrakt von Bedeutung. (Delves & Roitt, 2000)

2.2.1.1 Makrophagen

Makrophagen besitzen Rezeptoren für Carbohydrate, durch die sie körperfremde Moleküle detektieren können (Fraser et al., 1998). Bei AD reichern sich Makrophagen in akut und chronisch entzündeter Haut an (Kasraie & Werfel, 2013). In der Anfangsphase üben sie proinflammatorische Funktionen, wie Antigen-präsentierende Phagozytose (Kasraie & Werfel, 2013) und die Produktion inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren, die das Wachstum neuer Kapillaren, Kollagensynthese und Fibrose (Mirza et al., 2009) und dadurch die Auflösung der Entzündung und den Wundheilungsprozess fördern, aus. Letzterer verläuft über die Stadien Hämostase, Inflammation, Proliferation, Angiogenese, Reepithelialisierung und *Remodeling* (Delavary et al., 2011; Lucas et al., 2010). Bei Andauern der proinflammatorischen Aktivität und veränderter Funktion der Makrophagen folgt eine chronische Entzündung (E. Y. Kim et al., 2008; Valledor et al., 2010).

2.2.1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen, wie z. B. Langerhans-Zellen in der Haut, sind zuständig für die Endozytose von extrazellulären Antigenen (Delves & Roitt, 2000). Sie entscheiden über Beginn und Art der Immunantwort (Stary et al., 2005). In der Haut von AD Patienten werden sie von *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) sensitiviert und migrieren zu Lymphknoten und zu naiven T-Zellen, damit diese IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren und gleichzeitig IL-10 und Interferon- γ (IFN- γ) unterdrücken (Soumelis et al., 2002). In Läsionen von AD Patientinnen und Patienten können neben Langerhans Zellen und dermalen myeloiden dendritischen Zellen zwei Arten von Dendritischen Zellen nachgewiesen werden: CD1a⁺CD1c⁺Fc ϵ RI⁺IgE⁺CD207⁻ myeloide dendritische Zellen in der Epidermis und Dermis, sowie CD123⁺BDCA-2⁺CD45RA⁺CD68⁺ plasmazytoide dendritische Zellen in der Dermis (Stary et al., 2005).

2.2.1.3 *Basophile und Mastzellen*

Basophile und Mastzellen sind sich in ihren Funktionen ähnlich (Abraham & Arock, 1998). Sie besitzen FcεRI Rezeptoren für IgE (Kinet, 1999). Durch die IgE-Antikörper auf ihrer Oberfläche fördern sie die Sekretion von Entzündungsmediatoren, z. B. Histamin, Zytokine und proinflammatorische Chemokine (Otsuka & Kabashima, 2015). Damit spielen Basophile und Mastzellen eine große Rolle bei der Pathogenese atopischer Krankheiten wie Allergien, Heuschnupfen, Asthma und atopischer Dermatitis (Delves & Roitt, 2000; Ito et al., 2011), so zeigen diesbezüglich viele Studien erhöhte Zahlen von Mastzellen und Basophilen in der Haut von AD Patientinnen und Patienten (Ito et al., 2011; Otsuka & Kabashima, 2015).

2.2.1.4 *Natürliche Killer-Zellen*

NK-Zellen zerstören infizierte und maligne Zellen (Biron et al., 1999), die IFN- γ produzieren können. Bei AD Patientinnen und Patienten ist die Anzahl an NK-Zellen im peripheren Blut verringert (Katsuta et al., 2006), was für eine Anreicherung der NK-Zellen im Gewebe sprechen könnte (von Bubnoff et al., 2010), wie es auch in einem Tiermodell zu Asthma beobachtet werden kann (Schuster et al., 2000). Kurz nach einer Stresssituation ist ein Anstieg von NK-Zellen im Blut von AD Patientinnen und Patienten messbar, im Gegensatz zu nicht-atopischen Personen; dies spricht für eine immunologische Relevanz dieser Zellen in der Pathogenese von AD (Schmid-Ott et al., 2001).

2.2.1.5 *Zytokine und Chemokine*

Zytokine sind regulatorische Botenstoffe (Yoshimura et al., 2018), die für das Abwehren bakterieller und viraler Angriffe auf das Immunsystem zuständig sind (Gee et al., 2009).

Interleukin 4

IL-4 ist ein antiinflammatorisches Zytokin. Es wird von Th2-Zellen, Mastzellen, B-Zellen und Bindegewebszellen ausgeschüttet. Die Hauptaufgaben von IL-4 sind das Fördern der Th2-Zellentwicklung und die Inhibition der Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten proinflammatorischen Zytokinsynthese (Opal & DePalo, 2000). Der monoklonale Antikörper Dupilumab bspw. bindet an den IL-4 Rezeptor und

kann so als Therapie bei atopischen Krankheiten genutzt werden (Harb & Chatila, 2020).

Interleukin 12p70

Das proinflammatorische Zytokin IL-12 besteht aus den Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40, die gemeinsam das bioaktive IL-12p70 darstellen (Gee et al., 2009; Vignali & Kuchroo, 2012). Es wird gebildet von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen und kann sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen zur IFN- γ -Produktion anregen (Ma & Trinchieri, 2001). Bei AD tritt IL-12 darüber hinaus in nicht-läsionalen Hautstellen vermehrt auf, was für seine wichtige Rolle bei einer systemischen Entzündung spricht (Brunner et al., 2017).

Interleukin 17A

IL-17A ist ein proinflammatorisches Zytokin (Abusleme & Moutsopoulos, 2017) und fungiert als Signalzytokin der Th17-Zellen (Harrington et al., 2005). Es ist beteiligt an Autoimmuntzündungen (Fletcher et al., 2020) und wird unter anderem von Th17-Zellen und CD8 T-Zellen sezerniert (Cheuk et al., 2014). Es wird als essentieller Faktor in der Pathogenese von AD beschrieben (Souwer et al., 2010). In der akuten Phase wird es vermehrt nachgewiesen (Toda et al., 2003), in der chronischen Phase dagegen kaum (Nogales et al., 2009).

Thymic Stromal Lymphopoietin

Das proinflammatorische Zytokin TSLP wird in humanen Hautepithelzellen exprimiert (Jariwala et al., 2011) und wirkt in den Keratinozyten als Trigger für juckreizbedingtes Kratzen und die Entwicklung des typischen klinischen Bildes für AD (M. Li et al., 2005). TSLP induziert eine Th2-Zell-getriebene Entzündung durch die Aktivierung von dendritischen Zellen und Mastzellen (Wang & Liu, 2009).

Chemokine sind eine Gruppe von Signalproteinen, die hauptsächlich für Chemotaxis von verschiedenen Zellen verantwortlich sind (Ugucioni et al., 1995).

Monocyte chemotactic protein 3

Das *Monocyte chemotactic protein 3* (MCP-3, auch *CC-chemokine ligand 7*) ist ein an Entzündungsprozessen beteiligtes proinflammatorisches Chemokin (Dahinden et al., 1994; van Damme et al., 1992). Nach Yawalkar et al. (1999) gibt es in der

Expression von MCP-3 keinen Unterschied zwischen der Haut von an AD erkrankten Personen und nicht-atopischen Personen. Allerdings kann in entzündeter Haut im Mausmodell eine erhöhte Produktion von MCP-3 in Th1- und Th2-Zellen nachgewiesen werden (Kaminuma et al., 2018).

2.2.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem reagiert bei wiederholter Exposition von Pathogenen mit verbesserten Antworten und beinhaltet antigenspezifische B- und T-Zellen (Delves & Roitt, 2000). Antigenpräsentierende Zellen präsentieren Antigene an Lymphozyten und tragen so zur Immunantwort bei; B-Zellen sezernieren Immunglobuline, das sind antigenspezifische Antikörper zur Eliminierung extrazellulärer Mikroorganismen (Delves & Roitt, 2000).

2.2.2.1 T-Zellen

T-Zellen unterstützen B-Zellen bei der Antikörperproduktion und können auch Makrophagen aktivieren und selbst von Viren infizierte Zellen angreifen (Delves & Roitt, 2000).

Th1- und Th- Zellen

In akuten Läsionen herrschen Th2-Zellen vor, die IL-4, IL-13 und IL-31 produzieren, was die Dysfunktion der Barriere verstärkt und zum Juckreiz beiträgt; in chronischen Läsionen dagegen herrschen Th1-Zellen vor, die IFN- γ und IL-12 sezernieren (Peters & Peters, 2019). Weitere Details zu Th1- und Th2-Zellen bei AD finden sich in den Kapiteln 2.1.3.2 und 2.2.3.

Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) können Immunantworten durch direkte Signalwirkungen zwischen Zellen, das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 sowie die Sekretion von *Transforming growth factor β* und IL-10 (Umetsu et al., 2003) unterdrücken. Bei AD Patienten ist die Anzahl von Treg Zellen im peripheren Blut erhöht (Lesiak et al., 2012). Die Rolle von Treg Zellen bei der Pathogenese von AD ist nach Auriemma et al. (2013) nicht eindeutig geklärt. Nach einer Stimulation durch Superantigen verlieren Treg Zellen ihre immunsuppressive Funktion, möglicherweise wirken sie also nicht in der Haut von AD Patienten (Ou et al., 2004). Andere Studien (Lin et al., 2011) hingegen schreiben Treg Zellen in

mit *S.aureus* besiedelter Haut von AD Patienten eine ähnliche Rolle wie Th2-Zellen zu.

Th17-Zellen

Th17-Zellen sind beteiligt an der Rekrutierung von Neutrophilen und scheinen eine Rolle bei allergischen Krankheiten zu spielen (Brandt & Sivaprasad, 2011). Die Anzahl von Th17-Zellen bei AD Patientinnen und Patienten kann erhöht (Koga et al., 2008) oder erniedrigt (Guttman-Yassky et al., 2008; Hayashida et al., 2011) sein. Möglicherweise ist dies abhängig davon, ob sich die Patienten in der initialen Th2-dominierten oder der chronischen Th1-dominierten Phase der AD befinden (Cesare et al., 2008; Koga et al., 2008).

2.2.2.2 *B-Zellen*

B-Zellen können Antikörper synthetisieren (Mauri & Bosma, 2012) wie bspw. IgE (Vercelli et al., 1989).

Nach einer Studie von Schäfer et al. (1999) haben 75% der Studienpatientinnen und Studienpatienten mit AD einen erhöhten Serum-IgE-Spiegel im Gegensatz zu 36% der Kontrollgruppe. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit und der Konzentration von allergenspezifischem IgE (Schäfer et al., 1999). Viele an AD erkrankte Personen weisen IgE-Antikörper gegen *S. Enterotoxin A* und *B* (Leung et al., 1993), Hausstaubmilben (Tan et al., 1996) oder verschiedene Arten von Pilzen (Arzumanyan et al., 2003; Scalabrin et al., 1999) auf. Zusätzlich finden sich auch häufig IgE-Antikörper gegen Autoantigene (Altrichter et al., 2008; Valenta et al., 1996).

2.2.3 Entzündungskaskade bei atopischer Dermatitis

Wie bereits in Kapitel 2.1.3.2 erwähnt, weisen AD Patientinnen und Patienten ein Th1/Th2-Ungleichgewicht zugunsten von Th2-Zellen auf (Wollenberg et al., 2000). Diese Zellen zirkulieren im Blut, was zu einer Erhöhung des Serum-IgE-Spiegels und zu einer erhöhten Anzahl an Eosinophilen führt. Die Th2-Zellen exprimieren *Cutaneous lymphocyte-associated antigen* und rezirkulieren durch nicht-betroffene Hautstellen (Boguniewicz et al., 2006). Dort binden sie an Allergen-induzierte IgE-positive Langerhans-Zellen und Mastzellen, welche zur Entwicklung von Th2-Zellen beitragen (Leung et al., 2004a).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, werden bei einer Hautverletzung durch Umweltallergene, Kratzen oder mikrobielle Toxine Keratinozyten aktiviert, die proinflammatorische Zytokine und Chemokine freisetzen. Diese wiederum induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothelien und erleichtern damit den Übertritt von Entzündungszellen in die Haut. TSLP und von dendritischen Zellen stammendes IL-10 fördert ebenfalls die T-Zell-Differenzierung (Leung et al., 2004a).

Bei einer akuten Entzündung herrschen Th2-Zellen vor; wird die Entzündung jedoch chronisch, kommt es zu einer Infiltration von inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen, Makrophagen und Eosinophilen. Durch diese Zelltypen steigt die Produktion von IL-12, was zu einem *Switch* von Th2-Zellen zu Th1-Zellen und einer gesteigerten $\text{IFN}\gamma$ -Expression führt (Leung et al., 2004a; Novak & Bieber, 2005).

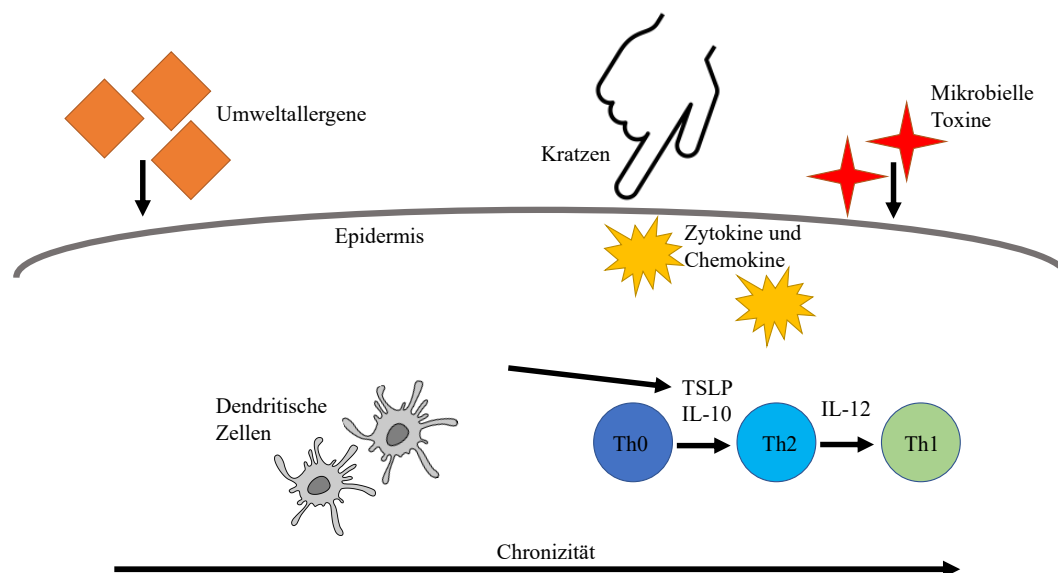


Abbildung 3: Pathogenese der atopischen Dermatitis, adaptiert nach Leung et al. (2004a)

2.3 Tiermodelle für atopische Dermatitis

In der Literatur werden 3 verschiedene Möglichkeiten für AD Tiermodelle beschrieben (Jin et al., 2009):

- Induzierte AD durch kutane Applikation von Allergenen oder Chemikalien
- Transgene Mäuse mit Über- oder Unterexpression
- Spontane Entwicklung einer AD

2.3.1 Induzierte atopische Dermatitis durch kutane Applikation von Allergenen oder Chemikalien

Durch Hautverletzungen und Sensitivierung von Mäusen mit dem Allergen Ovalbumin (Hühnereiweiß) auf dem rasierten Rücken können sowohl Kratzverhalten als auch eine Verdickung von Epidermis und Dermis provoziert werden (Spergel et al., 1998). Ebenfalls ist eine Sensitivierung mit dem Hausstaubmilbenallergen *Der p 8* (Huang et al., 2003) oder Nahrungsmittelallergenen wie Kuhmilch und Erdnuss gemeinsam mit einem Cholera-toxin Adjuvans (X. M. Li et al., 2001) möglich. Weiterhin existiert ein Modell, bei dem die Tiere mit *S. Enterotoxin B*, einem von *S.aureus* produzierten Exotoxin mit Superantigeneigenschaften, sensitiviert werden (Laouini et al., 2003).

Daneben gibt es auch die Möglichkeit von Hapten-induzierten Mausmodellen. Dabei werden Haptene wie Oxazolone oder Trinitrochlorbenzen zur Sensitivierung verwendet, um eine allergische Kontaktdermatitis hervorzurufen. Nach wiederholten Sensitivierungen wird die Th1-dominierte Immunantwort zu einer chronischen Th2-dominierten Immunantwort, was einer humanen AD ähnelt (Man et al., 2008; Matsumoto et al., 2004; Nolte et al., 2013a; Pail et al., 2019; Tsukumo et al., 2010).

2.3.2 Transgene Mäuse mit Über- oder Unterexpression

Transgene Mäuse mit einer Überexpression von IL-4 in der Haut entwickeln eine pruritische inflammatorische Hauterkrankung, die alle Hauptmerkmale einer humanen AD aufweist (Chan et al., 2001). Bei einer Überexpression von IL-31 zeigen Mäuse starken Juckreiz, Alopezie und Hautläsionen (Dillon et al., 2004).

Mäuse mit einer Expression von keratinozytenspezifischem durch Tetrazyklin auslösbarem TSLP Transgen entwickeln durch eine hautspezifische Überexpression von TSLP einen AD-ähnlichen Phänotyp mit Ekzemen (Yoo et al., 2005).

Caspase-1 (CASP1) transgene Mäuse überexprimieren CASP1 in Keratinozyten. Die Tiere entwickeln eine Dermatitis und Hautulzera mit einer starken Keratinozytenapoptose (Yamanaka et al., 2000).

RelB gehört zur Familie der NF- κ B/Rel Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei stressinduzierten Immun- und Entzündungsreaktionen spielen (Jin et al.,

2009). RelB^{-/-} knockout Mäuse zeigen einen komplexen inflammatorischen Phänotyp und hämatopoetische Auffälligkeiten. Die Mäuse entwickeln eine spontane Dermatitis, welche der des Menschen ähnelt, allerdings ohne Juckreiz (Barton et al., 2000; Weih et al., 1997).

Die Cathepsin E (Cat E) Proteinase ist an einer Vielzahl von Entzündungsprozessen beteiligt. Cat E^{-/-} Mäuse entwickeln der humanen AD ähnelnde Hautläsionen (Tsukuba et al., 2003).

Eine Überexpression der Serinprotease Stratum corneum Chymotrypsin in Keratinozyten führt zu Hautinfektionen mit epidermaler Hyperplasie, Hyperkeratose, Hautentzündungen und starkem Juckreiz (Hansson et al., 2002).

Apolipoprotein C1 transgene Mäuse zeigen eine gestörte Hautbarriere mit erhöhtem transepidermalen Wasserverlust und entwickeln spontan eine schwere Dermatitis mit Verkrustungen, Lichenifikation, Exkorationen und Juckreiz (Nagelkerken et al., 2008).

2.3.3 Spontane Entwicklung einer atopischen Dermatitis

Der Inzuchtstamm Nc/Nga gilt als das erste Mausmodell für AD (Matsuda et al., 1997). Veränderungen der Hautbarrierefunktion, erhöhter transepidermalen Wasserverlust und ein beeinträchtigter Ceramidmetabolismus führen zu einer Prädisposition für die Entwicklung einer Dermatitis (Aioi et al., 2001). Die Tiere entwickeln unter konventionellen Haltungsbedingungen nach sekundärer Sensitivierung durch verschiedene umweltbedingte Aeroallergene spontane Hautveränderungen (Jin et al., 2009; Kawakami et al., 2007; Matsuda et al., 1997).

2.4 NOD.cg-Prkdc^{SCID} Il2rg^{tm1Wjl}/Szj Mäuse

Gewöhnliche Mausmodelle können das humane Organsystem nur bedingt widerspiegeln, besonders in Bezug auf das Immunsystem, welches sich in einigen Punkten, wie bspw. der speziesspezifischen Ausprägung von Immunzellen, von dem des Menschen unterscheidet (Zschaler et al., 2014).

Humanisierte Mausmodelle hingegen können einen Ausweg aus dieser Problematik darstellen. Die bedeutendste Entdeckung auf diesem Gebiet sind immundefiziente Mäuse mit Mutationen in der IL2R γ -Kette (IL2rg^{null}), die eine wichtige

Komponente für die Signalwege der Rezeptoren IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 darstellt (Sugamura et al., 1996). Wenn dies kombiniert wird mit der *Prkdc^{scid}* (*Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; severe combined immunodeficiency*) Mutation (McCune et al., 1988; Shultz et al., 2005), fehlt den Tieren zum einen die erworbene Immunität und zum anderen ein großer Teil der angeborenen Immunität (Walsh et al., 2017). Werden den Mäusen humane Zellen, Gewebe oder Immunsysteme transplantiert, entwickeln sie ein chimäres Immunsystem, das durch menschliche Immunzellen geprägt ist und die biologischen Reaktionen des humanen Organsystems genauer abbildet (Brehm et al., 2016; Theocharides et al., 2016).

Einer der möglichen Ansätze ist eine Rekonstitution mit humanen PBMCs (Allen et al., 2019; Mosier et al., 1988). Allerdings besteht nur ein begrenztes Zeitfenster für Experimente, da diese Tiere nach einiger Zeit eine letale xenogene *graft-versus-host-disease* (GVHD) entwickeln können (Ali et al., 2012; Shultz et al., 2012; Walsh et al., 2017).

Solche translationalen Modelle werden in vielen Bereichen der biomedizinischen Forschung, wie bspw. der Immunologie, genutzt, um Medikamente und deren zugrunde liegende Mechanismen zu evaluieren (Shultz et al., 2019).

In dieser Arbeit wird der verwendete Mausstamm NOD.cg-Prkdc^{SCID} Il2rg^{tm1Wjl}/Szj abgekürzt mit NOD Scid IL2R γ Chain^{null}.

3 Zielsetzung

Aufgrund des Fehlens von geeigneten Tiermodellen ist die Entwicklung und Validierung eines Mausmodells mit humanisiertem Immunsystem für AD wünschenswert. Mit einem derartigen Modell kann das Immunsystem einer individuellen Patientin oder eines individuellen Patienten dargestellt werden. Des Weiteren können PBMC als therapeutisches Ziel eingesetzt werden, was ebenfalls eine bessere Übertragbarkeit auf das humane Organsystem ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst unter Verwendung von topischer Sensitivierung eine stabile AD an Mäusen mit humanisiertem Immunsystem entwickelt und im Anschluss durch die Verwendung von Prednisolon validiert werden.

Zusätzlich soll überprüft werden, ob das Tiermodell die immunologischen Abläufe eines individuellen an AD Erkrankten darstellen kann. Dazu soll ein Immunprofil von Spenderpatientinnen und Spenderpatienten anhand von PBMC erstellt werden, welches dann mit dem Immunprofil aus den Milzen der Mäuse abgeglichen wird.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- Immunprofilierung der Spenderpatientinnen und Spenderpatienten
- Entwicklung eines humanisierten Mausmodells für AD
- Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Tiermodell
- Darstellung der Effekte von Prednisolon im Tiermodell



4 Material und Methoden

Nachfolgend werden die verwendeten Materialien und Methoden erläutert.

4.1 Rekrutierung und Auswahl der Spenderinnen und Spender

Die Rekrutierung der Spenderinnen und Spender erfolgte über private Kontakte, Aufrufe in sozialen Netzwerken und Lernplattformen. Nach Aufklärung und Einverständnis der Personen wurden 60 ml venöses Blut aus der Armbeuge für die Rekonstitution von Mäusen entnommen bzw. 20 ml Blut für die Immunprofilierung.

Es besteht ein Ethik-Votum (120-15) der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München.

4.2 Versuchstiere

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der Chirurgischen Klinik der LMU München, Nußbaumstraße 20, 80336 München unter optimierten Hygienebedingungen in individuell belüfteten Käfigen nach Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* und einem einer spezifisch pathogenfreien Haltung ähnelnden Hygienestandard.

Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen Nr. ROB-55.2-2532.Vet_02-19-129 genehmigt und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

4.3 PBMC Isolierung

Zur Isolierung der PBMC wurde den Patientinnen und Patienten mit einer Safety-Multifly-Needle (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) 60 ml venöses Blut aus der Armbeuge in Trinatriumcitratlösung (10 ml S-Monovetten, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) entnommen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit Hank's balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) vermischt und in vier jeweils mit 15 ml RotiSep 1077 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefüllte Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Diese wurden für 30 Minuten bei langsamer Reduktion der Geschwindigkeit ohne Abbremsung zentrifugiert (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die entstandene Interphase wurde in ein 50 ml Falcon (Carl Roth, Karlsruhe,

Deutschland) gegeben. Davon wurden 30 µl mit ebenfalls 30 µl Trypanblau (Trypan Blue solution, 0,4%; Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gemischt und zur Ermittlung der Zellzahl (Ehrlich, 1907; Ehrlich & Shiga, 1904; Strober, 1997) in eine Neubauer Zählkammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) geladen und unter einem Mikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gezählt. Die Zellzahl wurde auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen in 100 µl steriler 1×phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate-buffered saline*, PBS (RotiCell PBS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) mithilfe folgender Rechnung eingestellt:

$$\frac{[(Zellzahl \times 4) \times 2 \times 10^4] \times X}{Y} = ml \text{ PBS zur Resuspension}$$

X = Volumen der Interphase; Y = Gewünschte Zellzahl

4.4 Rekonstitution

Rekonstituiert wurden NOD Scid IL2R γ Chain^{null} Mäuse im Alter von 6-8 Wochen aus eigener Nachzucht sowie von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Die Mäuse wurden in einem Restraîner (Brentree Scientific, Brentree, MA, USA) fixiert und der Schwanz eine Minute lang mit einer Rotlichtlampe (Beurer, Ulm, Deutschland) erwärmt bis zum Hervortreten der *Vena caudalis dorsalis* und *mediana*. Pro Maus wurden mithilfe einer Insulin-BD Mikro-fine 0,33 mm (29G)×12,7 mm Spritze (Henry Schein, Melville, NY, USA) 100 µl der Zellsuspension intravenös injiziert, was 4×10^6 Zellen entspricht (Mosier et al., 1988; Palamides et al., 2016).

4.4.1 Tierzahlen und Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 81 NOD Scid IL2R γ Chain^{null} Mäuse mit dem Blut von 6 Personen rekonstituiert. Zusätzlich dienten 4 Tiere als nicht-rekonstituierte Kontrollgruppe. 16 Tiere dienten als unbehandelte Kontrollgruppe und 42 Tiere wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth, Karlsruhe, Deutschland) sensitiviert.

Zusätzlich zur Applikation von DMSO erhielten 23 Tiere 1 mg/kg Prednisolon oral. Eine detaillierte Übersicht der Anzahl der verwendeten Tiere pro Gruppe findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Darstellung der Tierzahlen pro Gruppe; in Klammern Angabe der vor Versuchsende getöteten bzw. verendeten Tiere

Spender/ Spenderin	Kontrolle	DMSO	Prednisolon	Gesamt
AD 1	4	8 (2)		12
AD 3	6	6	6 (1)	18
AD 4**	6	6	6	18
AD 5		6 (1)	6	12
AD 9		6	5	11
AD 10*		4		4
AD 14		6		6
Summe	16	42	23	81

** Im Versuch AD 10 wurden die Tiere nicht rekonstituiert, der Versuch diente als Kontrolle. ** Im Versuch AD 4 wurden die Tiere mit dem Blut einer nicht-atopischen Spenderin rekonstituiert, der Versuch diente als Kontrolle.*

4.4.2 Versuchsablauf

Am Tag 1 wurden die Mäuse mit 4×10^6 Zellen rekonstituiert.

An den Tagen 8, 15 (bei AD 9, AD 10 und AD 14 auch zusätzlich am Tag 19) und am Tag des Versuchsendes wurden die Haare an beiden Flanken auf einer Fläche von 1×2 cm durch Scheren und Enthaarung mit Enthaarungscreme (Balea, dm, Karlsruhe, Deutschland) nach Packungsangabe unter Isofluran-Narkose mit 4% Isofluran bei einer Sauerstoffflussrate von 4 l/min entfernt. An den Tagen 8, 15, 17, 19 und 21 wurden die Mäuse durch topische Applikation von jeweils 100 μ l DMSO Lösung (50%-iges DMSO-Ethanol-Gemisch; bei AD 14 wurde 100% DMSO verwendet) mit einer Pipette sensitiviert. An diesen Tagen wurde auch die Haut visuell inspiziert (Nolte et al., 2013a; Pail et al., 2019; Tsukumo et al., 2010). Das Gewicht der Tiere wurde an den Tagen 1, 8, 15 und 20 kontrolliert. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs in Tagen findet sich in Abbildung 4.

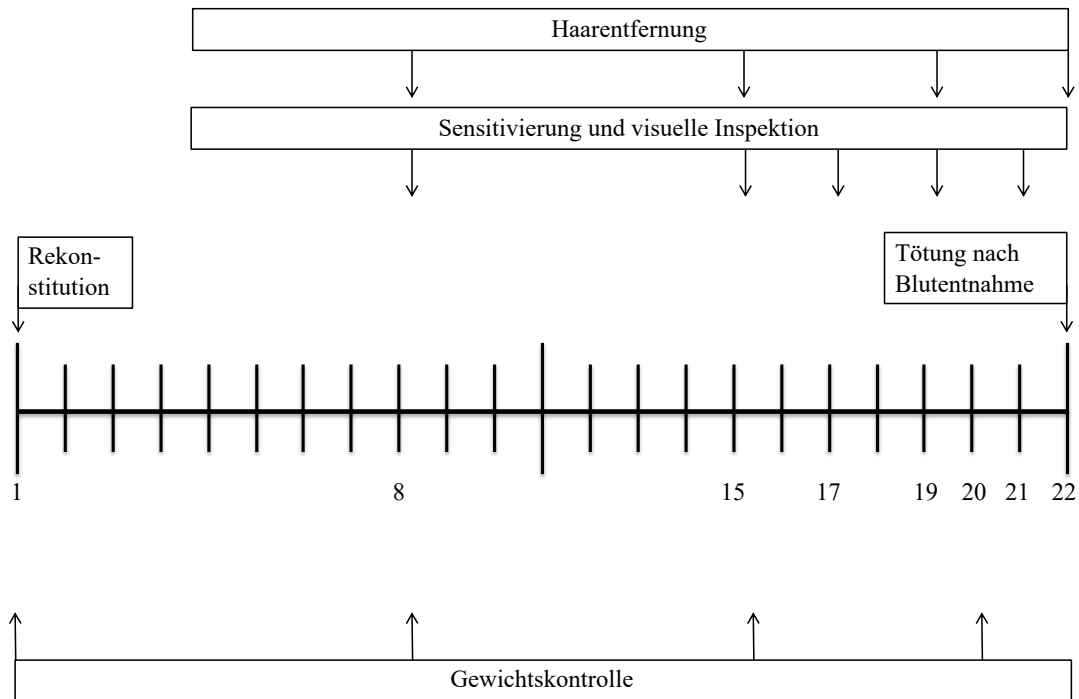


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs (in Tagen)

4.4.3 Herstellung und Applikation von Methylcellulosegel bzw. Prednisolon

Zur besseren Verträglichkeit wurde als Trägersubstanz ein Methylcellulosegel aus 0,2 g Methylcellulose (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und 40 ml sterilem 1×PBS hergestellt. Dies wurde für mindestens 30 Minuten mit einem Magnetrührer (Thermofisher, Waltham, MA, USA) vermischt.

Im Anschluss wurde eine Konzentration von 1 mg/kg aus Prednisolonpulver (Dosierung nach Müller (2017)) und dem Methylcellulosegel hergestellt.

Die hergestellte Prednisolonlösung wurde den Mäusen in einer Menge von 100 µl mit einer Oralnadel (Henry Schein, Melville, NY, USA) und einer 1-ml-Spritze (Henry Schein, Melville, NY, USA) per os verabreicht an den Tagen 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. Die Kontrollgruppe erhielt an diesen Tagen jeweils 100 µl Methylcellulosegel per os. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs inklusive der Medikamentenapplikation in Tagen findet sich in Abbildung 5.

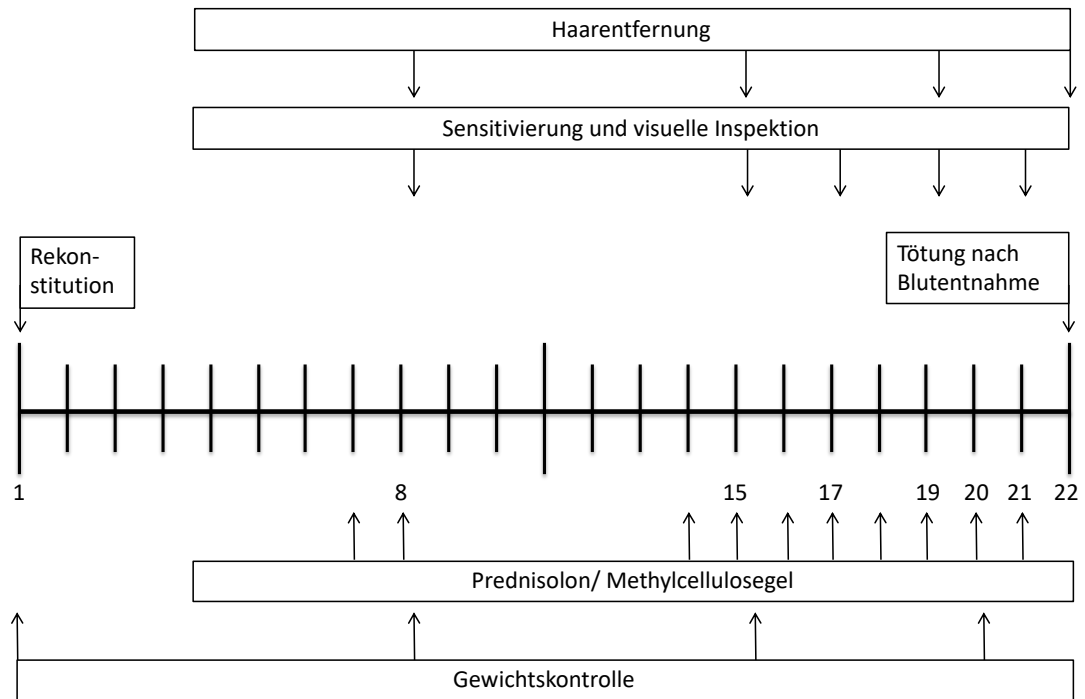


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs inklusive der Medikamentengaben (in Tagen)

4.4.4 Klinischer Score

Die Tiere wurden an den in Abbildung 5 unter „visuelle Inspektion“ aufgeführten Tagen nach den Kriterien des Score Sheets in Tabelle 2 beurteilt. Für jeden einzelnen Parameter wurden Abbruchkriterien festgelegt. Neben diesen Kriterien wurde ein Einzelscore von 4 bzw. bei Addition mehrerer Einzelscores ein Summenscore von 7 als hochgradige Belastung eingestuft und führten damit zu einem Abbruch des Versuchs. Alle Scores wurden anhand internationaler Kriterien erstellt (Man et al., 2008; Nolte et al., 2013a).

Tabelle 2: Kriterien, Ausprägung und Bewertung zur Erstellung eines klinischen Scores

Kriterien und Ausprägung		Punkte
Körpergewicht, Flüssigkeitsaufnahme	Kein Gewichtsverlust	0
	≥ 5 - < 10% Gewichtsverlust	1
	≥ 10 - < 15% Gewichtsverlust	2
	≥ 15 - < 20% Gewichtsverlust	3

Kriterien und Ausprägung		Punkte
	≥ 20% Gewichtsverlust	4
	Dehydratation (Hautfalte verstreicht sehr langsam)	3
	Dehydratation (Hautfalte bleibt stehen)	4
Kotkonsistenz	Geformt	0
	Breiig	2
	Flüssig	4
Fell	Normal, glänzend	0
	Stumpf, gestäubt (Haarverlust durch übermäßige Fellpflege ≤ 2 Tage)	1
	Stumpf, gestäubt (> 2 Tage)	2
	Haarverlust durch Barbering oder Dalila Effekt	2
Verhalten	Normal (lebhaft)	0
	Ruhig, kein exploratives Verhalten	1
	Hyperkinese	2
	Somnolenz, Zittern	3
	Apathie	4
Atmung	Normal	0
	Leicht erhöhte Atemfrequenz	1
	Erhöhte Frequenz mit abdomineller Atmung	2
	Deutlich reduzierte Atmung	3
	Ausgeprägte abdominelle Atmung und Zyanose	4
Körperhaltung	Normal	0

Kriterien und Ausprägung		Punkte
	Krämpfe, Lähmungen	4
	Gekrümmter Rücken	4
Verletzungen	Oberflächliche Bisswunden der Haut	2
	Tiefe Bisswunden (Muskel/ Bindegewebe)	3
	Bisswunden (keine Wundheilung, infektiös, Selbstverstümmelung)	4
	Elefantenzähne	4
Haut	Keine Veränderung	0
	Rötung, Schuppenbildung, Nässe	2
	Ekzembildung, blutige Verkrustungen	4
Juckreiz	Leicht	1
	Mittel	2
	Extrem, mit Schlafstörung	4

Bei geringer Belastung (Einzelscore 1, Summenscore 1-3) wurde das betroffene Tier maximal noch über einen Zeitraum von 3 Tagen weiter beobachtet und täglich gescored; bei Verschlechterung des Zustandes wurden Maßnahmen entsprechend des neuen Scores eingeleitet.

Bei mittlerer Belastung (Einzelscore 2, Summenscore 4-5) wurde das Tier umgehend untersucht und maximal noch über einen Zeitraum von 2 Tagen beobachtet. Bei ausbleibender Besserung wurde das Tier danach unmittelbar getötet, um eine über das mittlere Maß hinausgehende Belastung in jedem Falle zu vermeiden.

Bei höherer mittlerer Belastung (Einzelscore 3, Summenscore 6-7) wurde das Tier umgehend untersucht und maximal noch über einen Zeitraum von einem Tag beobachtet. Bei ausbleibender Besserung wurde das Tier danach unmittelbar

getötet, um eine über das mittlere Maß hinausgehende Belastung in jedem Falle zu vermeiden.

Bei schwerer Belastung (Einzelscore 4, Summenscore ≥ 7) wurde das Tier unverzüglich getötet.

4.4.5 Makroskopischer Hautscore

Die Haut wurde makroskopisch betrachtet und anhand der in Tabelle 3 aufgeführten Kriterien in Anlehnung an Nolte et al. (2013a) beurteilt. Die Punkte der Einzelkriterien wurden summiert.

Tabelle 3: Kriterien, Ausprägung und Bewertung zur Erstellung eines makroskopischen Hautscores

Kriterium	Ausprägung	Punkte
Rötung	Vorhanden	1
Schuppenbildung	Vorhanden	1
Nässe	Vorhanden	1
Ekzembildung	Vorhanden	2
Blutige Verkrustungen	Vorhanden	2
Dehydratation	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	Hochgradig	3

Pro Maus wurden jeweils die rechte und die linke Flanke ausgewertet. Beispiele zur Evaluierung des makroskopischen Hautscores finden sich in Abbildung 6.

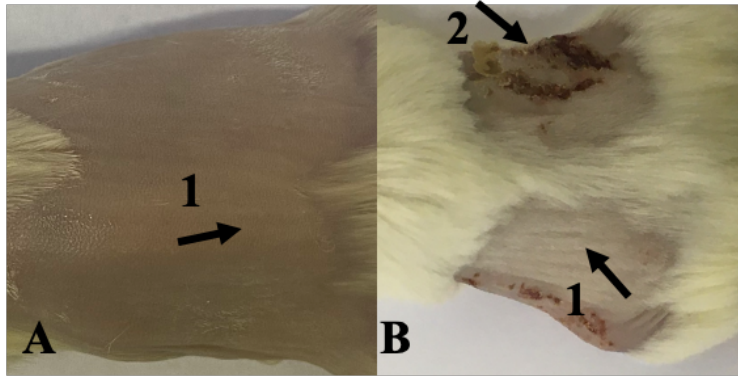


Abbildung 6: Beispiele zur Evaluierung des makroskopischen Hautscores

A = Score 1, B = Score 3; 1: Dehydratation, 2: Blutige Verkrustungen

4.4.6 Versuchsende

Am Tag 22 wurden die Mäuse mit einer Injektionsnarkose (3 mg Ketamin (Pfizer Inc., New York City, NY, USA) und 0,4 mg Xylazin (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)) anästhesiert. Die Injektionsnarkose wurde einen Tag vor dem Versuchsende folgendermaßen angesetzt und anschließend lichtgeschützt in Alufolie verpackt und im Kühlschrank (bei 5-7°C) gelagert:

- 1,5 Ketamin
- 1,0 ml Xylazin
- 5,0 ml NaCl

Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums folgten die retrobulbäre Entblutung und Tötung durch zervikale Dislokation. Die Mäuse wurden im Anschluss erneut enthaart durch Benutzung der o.g. Enthaarungscreme.

Für die Histologie wurde ein 1×1 cm großes enthaartes Hautstück entnommen und mit einem Schwämmchen in einer Einbettkassette (Rotilabo-Einbettkassetten; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 24 Stunden in Formalin (neutral buffered, 10%, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) fixiert.

Ein weiteres 1×1 cm großes enthaartes Hautstück wurde nach der Entnahme sofort in Trockeneis eingefroren für eine spätere Zytokinextraktion.

Die Milz wurde homogenisiert, um im Anschluss die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse zu färben.

4.5 Analysen nach dem Versuchsende

Hier erfolgt eine Beschreibung der nach dem Versuchsende durchgeführten Analysen.

4.5.1 FACS Analyse Versuchsende

Nachfolgend werden die Analysen der Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) aus den Zellen der Milzen erläutert.

4.5.1.1 Vorbereitung der Milz

Die Milz wurde über einem 70 µm Zellsieb (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) homogenisiert und mit jeweils 10 ml 1×PBS gewaschen. Das Homogenisat wurde bei 3,0 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und für die Durchflusszytometrie angefärbt.

4.5.1.2 FACS Färbung

Von den entstandenen Zellsuspensionen wurden jeweils 100 µl mit 100 µl FACS-Färbelösung für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Färbelösungen enthielten jeweils 100 µl FACS-Puffer sowie 0,5 µl Antikörper. Färbungen mit Sekundärantikörper wurden für weitere 30 Minuten gefärbt. Eine Auflistung aller verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 4. Alle Proben wurden mit einem Attune NxT Durchflusszytometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) gemessen und mit der Software FlowJo 10.1 (FlowJo LLC, OR, USA) ausgewertet. Alle in Tabelle 4 aufgelisteten Antikörper wurden von Biolegend (San Diego, CA, USA) bezogen.

FACS Puffer:

- 500 ml 1×PBS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 ml Ethylendiamintetraessigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 ml fötales Kälberserum (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)

Tabelle 4: FACS-Antikörper

Oberflächenmarker	Farbe	Katalognummer
Anti-mouse CD45	PE/Cy7	103113
CCR10	APC	341505
CD103 (Integrin aE)	APC	350215
CD11b	APC/Cy7	301341
CD11c	PE/Cy7	301607
CD127 (IL-7Ra)	PerCP/Cy5.5	351321
CD134 (OX40)	PE	350003
CD14	APC/Cy7	325619
CD163	FITC	333617
CD183 (CXCR3)	FITC	353703
CD19	PerCP/Cy5.5	302230
CD194 (CCR4)	PE	359411
CD196 (CCR6)	PE/Cy7	353417
CD197 (CCR7)	APC	353213
CD1a	Biotin	300112
CD206 (MMR)	APC	321109
CD25	PE/Cy7	302611
CD252 (OX40L)	PE	326307
CD27	PE/Cy7	356411
CD38	PE	356603
CD4	APC/Cy7	317417

Oberflächenmarker	Farbe	Katalognummer
CD45	APC/Cy7	368515
CD45RA	PE/Cy7	304125
CD45RO	PE	304205
CD62L	FITC	302611
CD64	PerCP/Cy5.5	305023
CD69	FITC	310903
CD8	PerCPCy5.5	300923
CD80	PE/Dazzle	305229
CD86	PerCPCy5.5	305419
IgD	APC/Cy7	348217
Streptavidin	FITC	405201
TSLPR	APC	322807

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Antikörper gegen menschliche Zellen; PE = Phycoerythrin; Cy5.5 bzw. Cy7 = Cyaninfarbstoffe bei Tandemkonjugaten; CCR = CC-Chemokine Rezeptor; APC = Allophycocyanin; PerCP = Peridinin-Chlorophyll; FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat; TSLPR = Thymic stromal lymphopoietin Rezeptor

4.5.1.3 Gating-Strategie

Durch *Gaten* der verschiedenen gemessenen Zellen können Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander differenziert werden.

Mithilfe der Parameter *side-scatter-height* und *forward-scatter-height* wurde aus den mit dem Durchflusszytometer gewonnenen Messdaten der Bereich definiert, der die Leukozytenpopulation festlegt.

Zur Beurteilung des Rekonstitutionsgrades wurde diese weiter unterteilt in hCD45 (humane Leukozyten) und mCD45 (murine Leukozyten). Der Rekonstitutionsgrad beschreibt den Prozentanteil der humanen Zellen an der Gesamtleukozytenkonzentration.

Single cells wurden definiert durch *side-scatter-height* und *side-scatter-area*. Zelloberflächenmarker konnten durch Bindung an spezifische Fluorochrome identifiziert werden.

Durch CD19, CD27 und IgD wurden die B-Zellen wie in Tabelle 5 dargestellt definiert:

Tabelle 5: *Definition von B-Zell Subtypen anhand ihrer Oberflächenmarker*

Oberflächenmarker	B-Zell Subtypen
CD27 ⁺ IgD ⁺	Naive B-Zellen
CD27 ⁺ IgD ⁻	<i>Affinity-matured</i> B-Zellen
CD27 ⁻ IgD ⁺	<i>Early memory</i> B-Zellen
CD27 ⁻ IgD ⁻	<i>Unconventional memory</i> B-Zellen

Durch CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD62L und CCR7 wurden die T-Zellen wie in Tabelle 6 dargestellt definiert:

Tabelle 6: *Definition von T-Zell Subtypen anhand ihrer Oberflächenmarker*

Oberflächenmarker	T-Zell Subtypen
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD62L ⁺	Naive CD4/CD8 Zellen
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD62L ⁺	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD62L ⁻	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD62L ⁻	Effektor T-Zellen

Helferzellen wurden als CD4⁺ und zytotoxische Zellen als CD8⁺ angesehen.

Die aktivierten T-Zellen wurden durch CD4, CD69, CD134, CD103, CD127 und CD25 differenziert. Hierbei wurden CD25⁺CD127^{low} als Treg definiert. Weiterhin erfolgte eine Unterscheidung anhand von CCR7.

T-Zellen bzw. B-Zellen wurden weiter differenziert durch CD38 und CD252.

Durch CD14 und CD16 erfolgte eine Unterteilung der Monozyten. CD14⁺ Zellen wurden weiter differenziert durch CD1a, CD252, TSLPR, CD64, CD163, CD206. CD163⁺CD206⁺ wurden als M2-Makrophagen angesehen.

Weitere Details zur Gatingstrategie finden sich in Kapitel 10.1.

4.5.2 Histologie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histologische Färbung wurde den Mäusen ein Hautstück der Größe 1×1 cm mit einer Schere entnommen und mit je einem Schwämmchen in einer Einbettkassette für eine Dauer von 24 Stunden in Formalin aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben in 70% Alkohol überführt und innerhalb von 7 Tagen durch einen Histomaten (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) automatisch verarbeitet. Dabei wurden die Proben zuerst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, anschließend der Alkohol durch Xylol ersetzt und die Proben mit flüssigem Paraffin (Tissue-Tek Paraffin Wax TEK III (Polymer), Sakura, Staufen, Deutschland) durchtränkt:

- 70% Ethanol: 2×2 h, 1×1 h
- 96% Ethanol: 2×1,5 h
- 100% Ethanol: 3×1,5 h
- Xylol: 1×1,5 h, 1×1 h
- Paraffin: 2×3 h

Am nächsten Tag erfolgte, sofort nach der Entnahme der Proben aus dem Histomaten, das Einbetten der Proben in Paraffin mittels einer Ausgießkonsole (Tissue-Tek TE 6 Embedding Module, Sakura, Staufen, Deutschland). Die Paraffinblöcke wurden für mindestens 24 Stunden bei -18°C gekühlt und anschließend mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Microm HM 355 S, Thermofisher, Waltham, MA, USA) mit einer Schnittdicke von 3 µm geschnitten, in einem Wasserbad (Medax Nagel, Kiel, Deutschland) geglättet und auf Menzel-Gläser SuperFrostPlus (Thermofisher, Waltham, MA, USA) aufgezogen.

Für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung in Anlehnung an das Protokoll von Wu (1940) wurden die Schnitte für 2×10 Minuten in Xylol (RotiHistol, Carl Roth,

Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und anschließend jeweils 2×5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (abs. Ethanol, 96%, 70%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) rehydriert. Die Proben wurden in zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest., Thermofisher, Waltham, MA, USA) gespült, für 4 Minuten in Hämalaun-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt und danach 10 Minuten lang unter laufendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit Aqua bidest. gespült und für 4 Minuten in Eosin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Im Anschluss wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (jeweils kurze Spülung in 80%, 96% und abs. Ethanol). Abschließend wurden die Schnitte 2×5 Minuten in Xylol fixiert und mit RotiHistokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einem 24×60 mm Deckglas (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgedeckt.

4.5.3 Histologischer Score

Der histologische Score wurde anhand der in Tabelle 7 aufgeführten Kriterien, angelehnt an Nolte et al. (2013a), beurteilt. Die Punkte der Einzelkriterien wurden summiert. Pro Maus wurde jeweils ein Schnitt ausgewertet.

Tabelle 7: Kriterien, Ausprägung und Bewertung zur Erstellung eines histologischen Scores

Kriterium	Ausprägung	Punkte
Einstrom von Entzündungszellen in die Epidermis	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	Hochgradig	3
Einstrom von Entzündungszellen in die Dermis	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	Hochgradig	3
Einstrom von Entzündungszellen in die Subcutis	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	Hochgradig	3

Kriterium	Ausprägung	Punkte
Mehrschichtiges Epithel	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
Verhornung	Vorhanden	1

Fotos der histologischen Schnitte wurden mit einer AxioCam 105 color Kamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) an einem Axiovert 40 CFL Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit 10-facher Vergrößerung (A-Plan, 10×/0,25 Ph1 M27, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Zur Aufnahme der Bilder wurde die Software Zen 2.3 (Blue Edition, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) genutzt. In Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) wurden Tonwert und Kontrast nachbearbeitet. Beispielfotos zur Evaluierung des histologischen Scores finden sich in Abbildung 7.

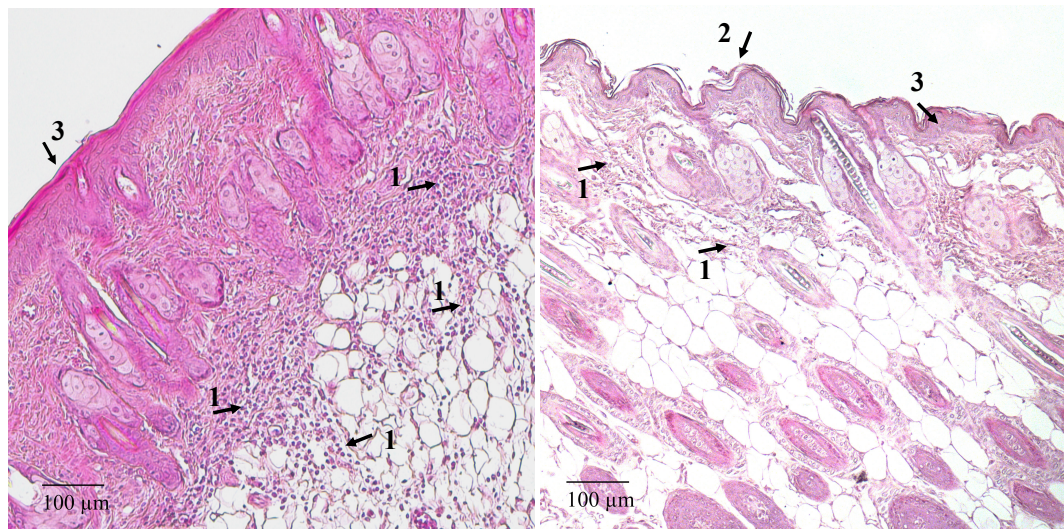


Abbildung 7: Beispiele zur Evaluierung des histologischen Scores; HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, links: Score 6, rechts: Score 7

1: Einstrom von Entzündungszellen, 2: Verhornung, 3: Mehrschichtiges Epithel

4.5.4 Luminex

Am Tag des Versuchsendes wurde jedem Tier ein 1×1 cm großes Hautstück entnommen und sofort auf Trockeneis tiefgefroren. Die gefrorenen Hautstücke wurden mit 750 µl eines Proteaseinhibitors (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail,

Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland; 1 Tablette gelöst in 25 ml 1×PBS) und einer Stahlkugel (Stainless Steel Beads, 5mm, Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem Safe-Lock Tube (2,0 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 Minuten bei 50 Hz in einen Tissue Lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden daraus zwei Aliquots hergestellt.

Zytokine wurden mithilfe der Mikropartikel-Array-Technologie nach Bobrow et al. (2006) mit dem Luminex ProcartaPlex Immunoassay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) analysiert. Das Proteinassay-Analysesystem basiert auf der Kodierung und Dekodierung von Beads (Fulton et al., 1997; Stöcker & Schlumberger, 2019). Beads sind magnetische Partikel, die mit fluoreszierenden Materialien markiert werden können (Chandler & Herren, 2001). Durch die Kombination verschiedener Beads konnten die gewünschten Zytokine gemessen werden. Die Immunoassay Kits (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) wurden folgendermaßen kombiniert:

ProcartaPlex Human High Sensitivity Basic Kit (Thermo Fisher Scientific Cat# EPX010-10420-901):

- ProcartaPlex Human IL-4 High Sensitivity Simplex (Thermo Fisher Scientific Cat# EPXS010-10225-901)
- ProcartaPlex Human IL-12p70 High Sensitivity Simplex (Thermo Fisher Scientific Cat# EPX01A-10238-901)
- ProcartaPlex Human IL-17A High Sensitivity Simplex (Thermo Fisher Scientific Cat# EPX01A-12017-901)

ProcartaPlex Mouse Basic Kit (Thermo Fisher Scientific Cat# EPX010-20440-901):

- ProcartaPlex Mouse MCP-3 (CCL7) Simplex (Thermo Fisher Scientific, Cat# EPX01A-26006-901)
- ProcartaPlex Mouse TSLP Simplex (Thermo Fisher Scientific Cat# EPX01A-26095-901)

Es wurden jeweils 50 µl der lysierten Hautproben verwendet. Gemessen wurden die Proben mit einem dreikanaligen Zytofluorometer MAGPIX (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA).

4.5.5 Immunprofilierung

Zusätzlich zur Rekonstitution von Mäusen wurden Immunprofilierungen (Jodeleit et al., 2019) von 21 AD Patientinnen und Patienten durchgeführt. Alle bekamen einen Fragebogen (siehe Kapitel 10.4) zu ihrer Krankheitsgeschichte und führten eine Selbsteinschätzung nach dem SCORAD (Oranje et al., 2007) Schema durch.

Es wurden jeweils 20 ml Blut entnommen, wie bereits beschrieben eine PBMC Isolierung durchgeführt (siehe Kapitel 4.3) und im Anschluss jeweils 100 μ l Zellen mit 100 μ l FACS-Färbung für eine Durchflusszytometrieanalyse angefärbt.

Zur FACS-Färbung und den dafür verwendeten Antikörpern siehe Kapitel 4.5.1.2. Die Stainings zur Differenzierung der B-Zellen, T-Zellen und Monozyten wurden bereits in Kapitel 4.5.1.3 beschrieben.

Zusätzlich wurden Makrophagen unterteilt in $CD11b^+$ und $CD11c^+$ und weiter definiert durch $CD1a$, $CD252$, $CD80/86$ und $TSLPR$.

Des Weiteren wurden TH22 Zellen mithilfe von $CD4$, $CD8$, $CXCR3$, $CCR4$, $CCR6$ und $CCR10$ untersucht. $CD4^+CCR4^+CCR6^+$ Zellen wurden als TH17-Zellen definiert.

4.5.6 Statistik

Die gewonnenen Daten wurden mithilfe der freien Statistik-Software R innerhalb RStudio (www.rstudio.com, Version 4.0.2) analysiert. Es wurden folgende Pakete genutzt: `readxl`, `psych`, `extrafont`, `car`, `carData`, `tibble`, `dplyr`, `tidyr`, `stringr`, `ggplots`, `ggplot2`, `dabestr`, `magrittr`, `RColorBrewer`, `heatmaply`, `ropls`.

Es wurde bei allen Stichproben mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests und der Erstellung eines Histogramms auf Normalverteilung getestet, mithilfe des Levene-Tests wurde auf Varianzhomogenität getestet.

Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen mit nicht-normalverteilten Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon-Test) durchgeführt. Für die statistische Analyse mehrerer Gruppen mit nicht-normalverteilten Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test und post hoc ein paarweiser Wilcoxon-Test mit einer Anpassung des Signifikanzniveaus durch eine Bonferroni-Holm-Korrektur (Dunn Procedure)

durchgeführt. Aufgrund der nicht-normalverteilten Daten, konnten kein t-Test und keine ANOVA-Analyse durchgeführt werden.

Zur Quantifizierung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen wurde eine *orthogonal partial least squares discriminant analysis* (oPLS-DA) durchgeführt.

Bei allen Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% angenommen.

Das Signifikanzniveau (Signifikanzwert p) wurde folgendermaßen definiert:

* $p = 0,05 - 0,01$

** $p = 0,01 - 0,001$

*** $p < 0,001$

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse vorgestellt.

5.1 Auswertung der Spenderinnen und des Spenders

In Tabelle 8 folgt eine Übersicht über die Personen, die Blut für die Tierversuche spendeten. Die Daten wurden anhand eines Fragebogens (siehe Kapitel 10.4) durch Selbsteinschätzung ermittelt. Alle Teilnehmerinnen und der Teilnehmer, mit Ausnahme von AD 4, waren chronisch an AD erkrankt. Das mittlere Alter der Teilnehmerinnen und des Teilnehmers betrug 24,83 Jahre bei einer Spanne von 20 bis 28 Jahren. 5 Personen (83,33%) waren weiblich und 1 Person (16,67%) männlich. Für die Erfassung der Krankheitsaktivität der Patientinnen und des Patienten wurde jeweils der SCORAD (Oranje et al., 2007) errechnet. Er betrug 14,52 Punkte im Mittelwert bei einer Spanne von 8,18 bis 17,50 Punkten.

Tabelle 8: Übersicht über die Spenderpatientinnen und den Spenderpatienten für die Tierversuche

Spender/ Spenderin	Geschlecht	Alter	SCORAD	Aktuelle Medikation
AD 1	Weiblich	25	17,36	Keine
AD 3	Weiblich	25	17,26	keine
AD 4*	Weiblich	28	-	-
AD 5	Weiblich	25	17,50	Glukokortikoid, topisch
AD 9	Männlich	20	12,30	Glukokortikoid, topisch
AD 10**	-	-	-	-
AD 14	Weiblich	26	8,18	keine

** Im Versuch AD 4 wurden die Tiere mit dem Blut einer nicht-atopischen Spenderin rekonstituiert, daher wurde kein SCORAD erhoben, der Versuch diente als Kontrolle; ** Im Versuch AD 10 wurden die Tiere nicht rekonstituiert, die Versuche dienten als Kontrolle*

5.2 Immunprofilierung

In Tabelle 9 folgt eine Übersicht über die Personen, die Blut für die Immunprofilierungen spendeten. Die Daten wurden anhand eines Fragebogens (siehe Kapitel 10.4) durch Selbsteinschätzung ermittelt. Alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer waren chronisch an AD erkrankt. Das mittlere Alter betrug 24,04 Jahre bei einer Spanne von 19 bis 32 Jahren. 13 Personen (61,9%) waren weiblich und 8 Personen (38,10%) männlich. Für die Erfassung der Krankheitsaktivität der Patientinnen und Patienten wurde jeweils der SCORAD (Oranje et al., 2007) errechnet. Er betrug im Mittelwert 20,49 Punkte bei einer Spanne von 4,07 bis 56,18 Punkten.

Tabelle 9: Übersicht über die Spenderpatientinnen und Spenderpatienten für die Immunprofilierungen

Dunkelblau markiert sind die Patientinnen und Patienten, deren PBMC für eine Rekonstitution genutzt wurden.

Spender/ Spenderin	Geschlecht	Alter	SCORAD	Aktuelle Medikation
AD 1	Weiblich	25	17,36	Keine
AD 3	Weiblich	25	17,26	Keine
AD 5	Weiblich	25	17,50	Glukokortikoid, topisch
AD 6	Männlich	20	13,54	Glukokortikoid, topisch
AD 7	Männlich	32	9,00	Keine
AD 8	Weiblich	21	29,02	Keine
AD 9	Männlich	20	12,30	Glukokortikoid, topisch
AD 11	Weiblich	23	56,18	Glukokortikoid, topisch
AD 12	Weiblich	24	6,26	Keine
AD 13	Weiblich	20	4,07	Glukokortikoid, topisch
AD 14	Weiblich	26	8,18	Keine
AD 15	Weiblich	26	12,77	Glukokortikoid, topisch

Spender/ Spenderin	Geschlecht	Alter	SCORAD	Aktuelle Medikation
AD 16	Männlich	32	43,72	Glukokortikoid, topisch
AD 17	Männlich	23	21,57	Glukokortikoid, topisch
AD 18	Weiblich	25	18,36	Keine
AD 19	Weiblich	26	50,32	Glukokortikoid, topisch
AD 20	Männlich	19	17,54	Glukokortikoid, topisch
AD 21	Weiblich	25	13,00	Keine
AD 22	Männlich	23	9,04	Glukokortikoid, topisch; Omalizumab; Fexofenadin; Salbutamol
AD 23	Männlich	23	12,61	Glukokortikoid, topisch; Omalizumab; Fexofenadin; Salbutamol
AD 24	Weiblich	22	40,74	Glukokortikoid, topisch; Triamincinolon, subcutan (s.c.)

In Tabelle 10 findet sich eine Zusammenfassung der grundlegenden demografischen Daten aller Teilnehmerinnen und Teilnehmer.

Tabelle 10: Zusammenfassung der grundlegenden demografischen Daten aller Spenderinnen und Spender

Parameter	AD Patienten bzw. Patientinnen, N = 21
Alter (in Jahren):	
Mittelwert (Standardabweichung, SD)	24,04 (3,43)
Spannweite	19 – 32
Geschlecht (männlich in %)	38,10%

Parameter	AD Patienten bzw. Patientinnen, N = 21
SCORAD:	
Mittelwert (SD)	20,49 (14,85)
Spannweite	4,07 – 56,18
Aktuelle Medikation:	
Keine (N)	8
Glukokortikoid, topisch (N)	14
Omalizumab (N)	2
Fexofenadin (N)	2
Salbutamol (N)	2
Triamcinolon, s.c. (N)	1

Den Patientinnen und Patienten wurde jeweils 20 ml Blut für die Immunprofilierung entnommen. Nach Isolierung der PBMC (siehe Kapitel 4.3) wurden jeweils 100 µl Zellen mit 100 µl FACS-Färbung für eine Durchflusszytometrieanalyse angefärbt (siehe Kapitel 4.5.5). Durch *Gaten* der verschiedenen gemessenen Zellen konnten Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander differenziert werden (siehe Kapitel 4.5.1.3 und 10.1).

Abbildung 8 zeigt eine hierarchische Clusterheatmap mit den Ergebnissen der Immunprofilierungen aus den FACS-Analysen. Die Anteile der Th1- und Th2-Zellen variierten hier bspw. sehr stark.

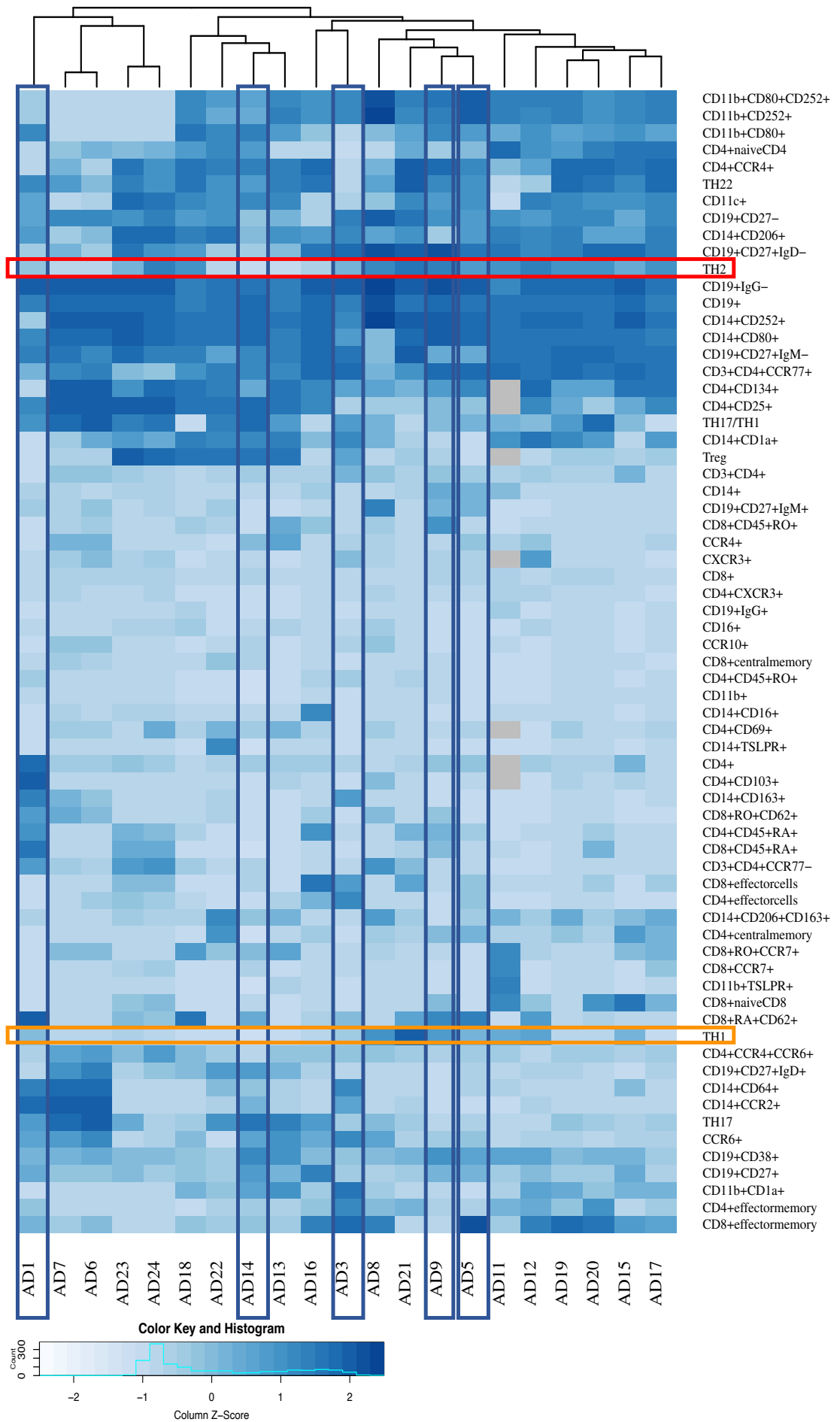


Abbildung 8: Hierarchische Clusterheatmap zur Darstellung der Immunprofilierungen aller an AD erkrankten Patientinnen und Patienten

Farbliche Visualisierung der PBMC-Daten aus der FACS-Analyse mit zweidimensionaler Abbildung und Darstellung einer ineinander geschachtelten Hierarchie von Gruppen von Patienten: Die Reihen und Spalten werden nach einer hierarchischen Gruppierung neu geordnet, d.h. ähnliche Beobachtungen liegen näher beieinander. Zur besseren Visualisierung wird anschließend ein Farbschema aufgetragen, indem die Farben der einzelnen Zellen proportional zu ihrer Position nach einem Farbgradienten markiert werden. So wird erkennbar, welche Variablen und Charakteristiken geclustert auftreten. Das schwarze Dendrogramm wird zur Visualisierung der entstehenden Baumstruktur genutzt: Jeder horizontale Ast repräsentiert ein Objekt oder Cluster der Datengesamtheit, vertikale Äste zeigen den Abstand, also die Ähnlichkeit, zweier Cluster zueinander; je kürzer die vertikalen Äste, desto ähnlicher sind die einzelnen Objekte zueinander. (Kibbey & Calvet, 2005) Auf der x-Achse sind die einzelnen Personen abgebildet, auf der y-Achse die gemessenen Zellpopulationen. Th1-Zellen sind orange markiert, Th2-Zellen sind rot markiert. Dunkelblau markiert sind die Patientinnen und Patienten, deren PBMC für eine Rekonstitution genutzt wurden. Grau = NA.

Abbildung 9 zeigt, dass sowohl die Anteile an Th1[%CD4⁺CXCR3⁺]- als auch die Anteile an Th2[%CD4⁺CCR4⁺]-Zellen zwischen den verschiedenen Patientinnen und Patienten zum Teil stark variierten.

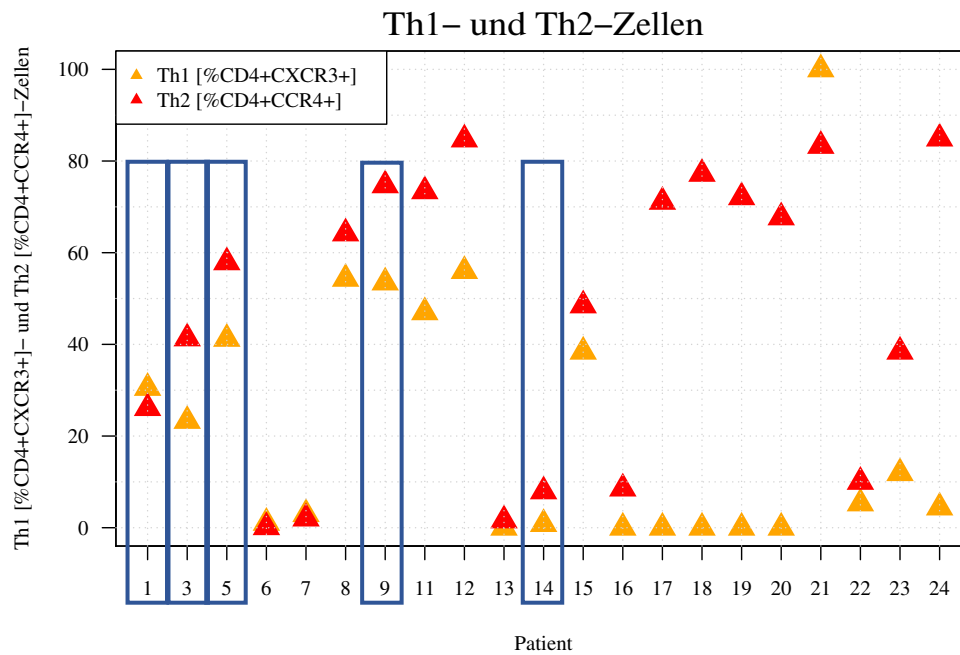


Abbildung 9: Verteilung der Th1 [%CD4⁺CXCR3⁺]- und Th2 [%CD4⁺CCR4⁺]-Zellen bei den einzelnen Spenderinnen und Spendern

Auf der x-Achse sind die Nummern der jeweiligen Patientinnen und Patienten aufgetragen, auf der y-Achse die Anteile der Th1-(orange) und Th2-Zellen (rot). Dunkelblau markiert sind die Patientinnen und Patienten, deren PBMC für eine Rekonstitution genutzt wurden

5.3 Rekonstitutionsgrad

Zur Überprüfung des Rekonstitutionsgrades wurde der Gesamtanteil der humanen Zellen mit dem Marker hCD45 angefärbt. Der Anteil der CD45⁺ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation betrug bei allen rekonstituierten Tieren im Mittel 14,23% ($\pm 7,47\%$) mit einer Spannweite von 35,24% (siehe Abbildung 10).

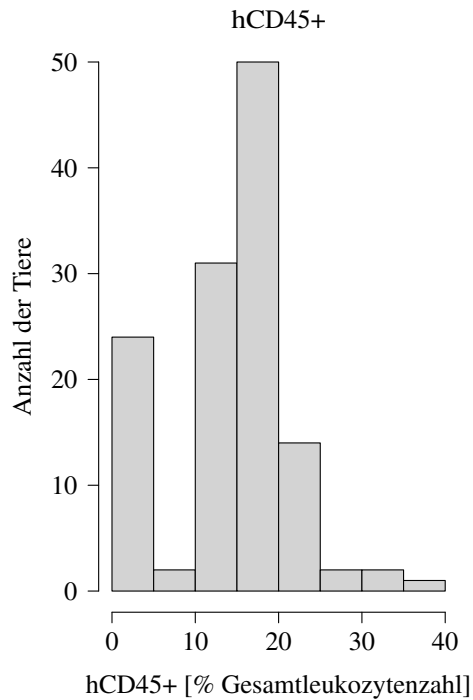


Abbildung 10: Histogramm zur Darstellung des Rekonstitutionsgrades

Auf der x-Achse ist der Prozentanteil von humanen CD45+ Zellen dargestellt, auf der y-Achse die Anzahl der Tiere.

5.4 Entwicklung des Modells

Hier werden die Ergebnisse einer Sensitivierung mit DMSO beschrieben.

5.4.1 Klinischer Score

Um die klinischen Auswirkungen einer Sensitivierung mit DMSO zu erfassen, wurde ein klinischer Score erhoben. Die Tiere wurden an den in Abbildung 5 aufgeführten Tagen nach den Kriterien des Score Sheets in Tabelle 2 beurteilt. Für die statistische Auswertung wurden die Tagesscores jedes einzelnen Tieres summiert.

Eine Sensitivierung mit DMSO führte bei Rekonstitution mit PBMC einer an AD erkrankten Person (Gruppe C) zum Ausbruch einer klinischen Symptomatik. Die Tiere zeigten Juckreiz, Rötungen und blutige Verkrustungen.

Gruppe A (keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO) erzielte einen mittleren klinischen Score von 0,5 Punkten (± 1 Punkt); Gruppe C (Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO) erzielte einen

mittleren klinischen Score von 1,2 Punkten ($\pm 1,9$ Punkte); die Gruppen B (Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO), D (Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung) und E (Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung) erzielten jeweils einen mittleren klinischen Score von 0 Punkten (± 0 Punkte).

Unterschiede zeigten sich vor allem zur Gruppe C. Jedoch waren die gemessenen Unterschiede nicht signifikant (siehe Abbildung 11).

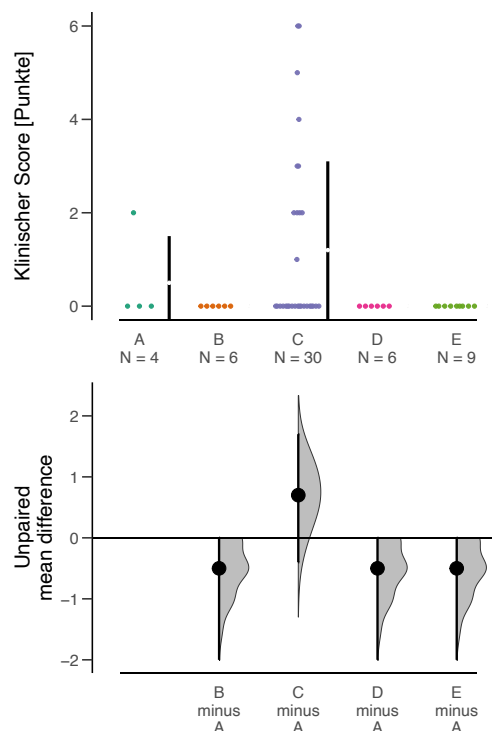


Abbildung 11: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung des klinischen Scores

A = keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO; B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung. Im oberen Teil der Grafik werden alle einzelnen Datenpunkte in einem Schwarmplot dargestellt. Standardabweichung (vertikale Linie) und Mittelwert (Lücke in der vertikalen Linie) jeder Gruppe werden rechts neben den Datenpunkten angezeigt. Im unteren Teil der Grafik werden die Effektgrößen dargestellt. Der Nullpunkt der horizontalen Achse beschreibt den Mittelwert der Referenzgruppe (hier Gruppe A). Die Punkte zeigen die Unterschiede zwischen den Gruppen als Effektgröße. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Verteilung des erwarteten Fehlers für den Unterschied zwischen den Mittelwerten dar. Je gewölbter die Kurve, desto kleiner ist der Fehler. Der Balken durch die Punkte zeigt das

Konfidenzintervall (95%) für den Unterschied zwischen den Mittelwerten. (Cumming, 2014; Ho et al., 2019)

5.4.2 Makroskopischer Hautscore

Am Tag des Versuchsendes wurde die Haut makroskopisch betrachtet und anhand der in Tabelle 3 aufgeführten Kriterien beurteilt. Die Punkte der Einzelkriterien wurden summiert. Pro Maus wurden jeweils die rechte und die linke Flanke ausgewertet (siehe Abbildung 6).

Eine Sensitivierung mit DMSO führte bei Rekonstitution mit PBMC eines atopischen Spenderpatienten/ einer atopischen Spenderpatientin zur Ausbildung von Hautfalten als Zeichen einer Dehydratation und blutigen Verkrustungen (siehe Abbildung 12).

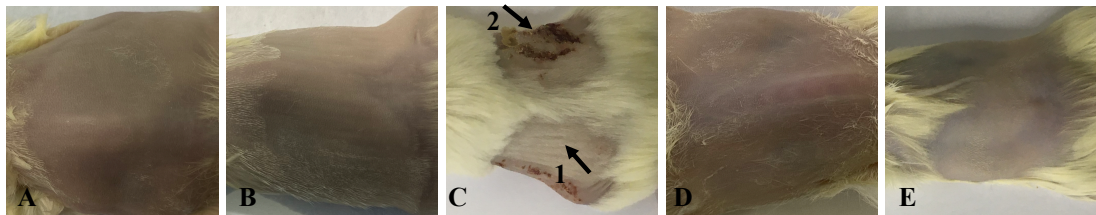


Abbildung 12: Vergleich des makroskopischen Hautscores

A = keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO, Score 0; B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Score 0; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Score 3; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung, Score 0; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung, Score 0

1: Dehydratation, 2: Blutige Verkrustungen

Gruppe A erzielte einen mittleren Hautscore von 0,5 Punkten (± 1 Punkt); Gruppe C von 1,33 Punkten ($\pm 1,15$ Punkte); die Gruppen B, D und E jeweils von 0 Punkten (± 0 Punkte).

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (* $p = 0,025$), C und D (* $p = 0,047$) sowie C und E (** $p = 0,004$).

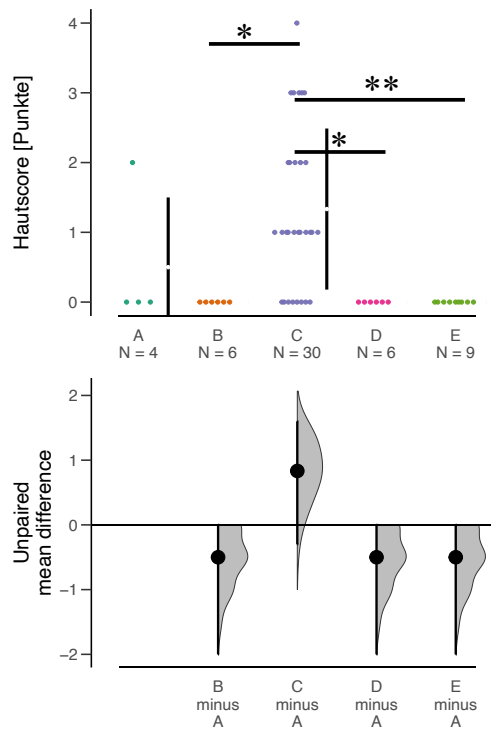


Abbildung 13: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung des makroskopischen Hautscores

A = keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO; B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung

5.4.3 Histologischer Score

Der histologische Score wurde anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe Kapitel 4.5.2) mithilfe der in Tabelle 7 aufgeführten Kriterien, angelehnt an Nolte et al. (2013a), beurteilt. Die Punkte der Einzelkriterien wurden summiert. Pro Maus wurde jeweils ein Schnitt ausgewertet.

Bei nicht rekonstituierten mit DMSO sensitivierten Tieren sowie bei mit PBMC von atopischen Spendern/ Spenderinnen rekonstituierten und nicht sensitivierten Tieren konnten im histologischen Score keine Auffälligkeiten festgestellt werden (siehe Abbildung 14).

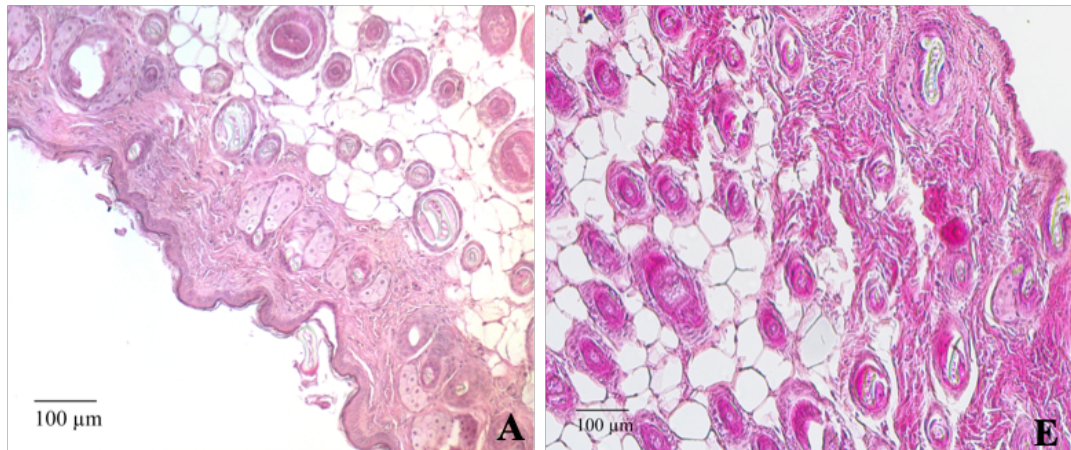


Abbildung 14: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, linkes Bild A = keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO, Score 0; rechtes Bild E = Kontrolle, keine Sensitivierung, atopischer Spender/ Spenderin, Score 0

Bei Rekonstitution mit PBMC einer nicht-atopischen Spenderin ohne Sensitivierung konnte ein Einstrom von Entzündungszellen festgestellt werden; bei Sensitivierung mit DMSO zusätzlich eine Verhornung (siehe Abbildung 15).

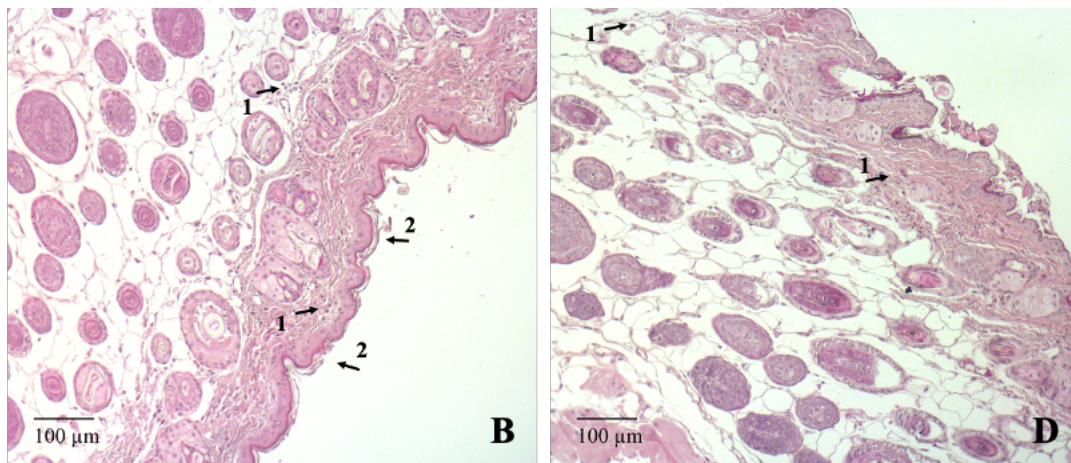


Abbildung 15: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, linkes Bild: B = nicht-atopische Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Score 3, rechtes Bild: D = nicht-atopische Spenderin, keine Sensitivierung, Score 2

1: Einstrom von Entzündungszellen, 2: Verhornung

Das histologische Bild der Haut der mit PBMC von atopischen Spendern/ Spenderinnen rekonstituierten und mit DMSO sensitivierten Tiere zeigte im Vergleich dazu einen Einstrom von Entzündungszellen, Verhornung und ein mehrschichtiges Epithel (siehe Abbildung 16).

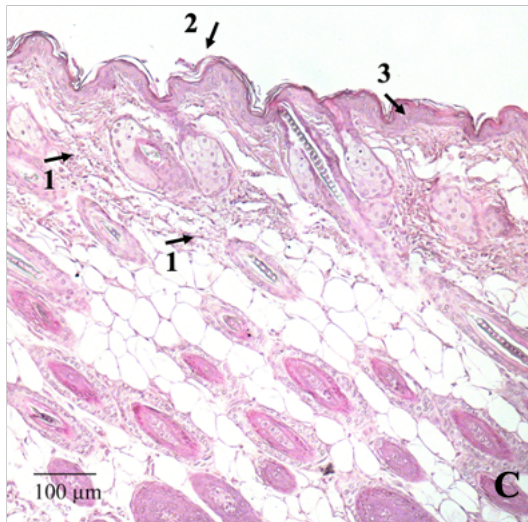


Abbildung 16: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung C = atopischer Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Score 7

1: Einstrom von Entzündungszellen, 2: Verhornung; 3: Mehrschichtiges Epithel

Gruppe A erzielte einen mittleren histologischen Score von 0,75 Punkten ($\pm 0,5$ Punkte), Gruppe B von 3,33 Punkten ($\pm 1,51$ Punkte), Gruppe C von 5,43 Punkten ($\pm 2,56$ Punkte), Gruppe D von 2 Punkten (± 0 Punkte) und Gruppe E von 0,56 Punkten ($\pm 0,73$ Punkte). Wie in Abbildung 17 ersichtlich, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen A und C (* $p = 0,012$), B und E (* $p = 0,020$), C und D (** $p = 0,002$), C und E (***) $p < 0,001$) sowie D und E (* $p = 0,028$).

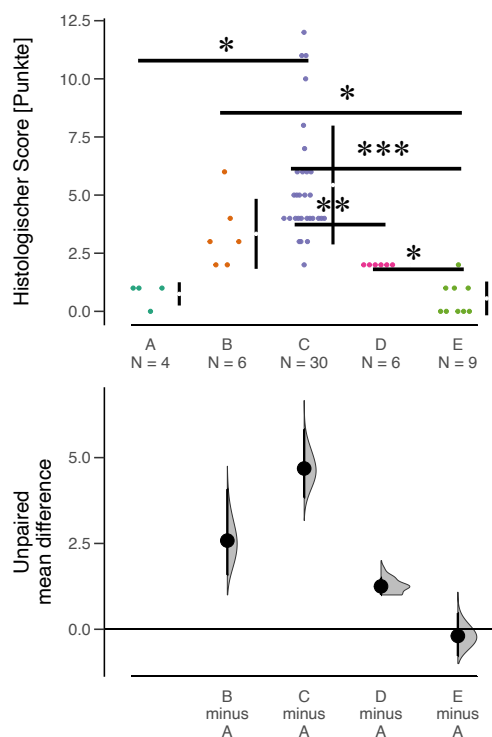


Abbildung 17: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung des histologischen Scores

A = keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO; B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung

5.4.4 Immunologisches Bild

Aus den Milzen der Mäuse wurden Zellsuspensionen hergestellt (siehe Kapitel 4.5.1.1), von denen jeweils 100 μ l mit 100 μ l FACS-Färbelösung angefärbt wurden (siehe Kapitel 4.5.1.2). Durch *Gaten* der verschiedenen gemessenen Zellen konnten Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander differenziert werden (siehe Kapitel 4.5.1.3 und Kapitel 10.1).

Die Mittelwerte der CD64⁺[%CD14⁺] betragen in der Gruppe B 71,95% (\pm 2,21%), in der Gruppe C 80,18% (\pm 6,19%), in der Gruppe D 72,20% (\pm 1,20%) und in der Gruppe E 73,98% (\pm 1,72%). Die Mittelwerte der CD206⁺[%CD14⁺] betragen in der Gruppe B 36,23% (\pm 4,45%), in der Gruppe C 26,27% (\pm 7,03), in der Gruppe D 23,08% (\pm 5,92%) und in der Gruppe E 24,49% (\pm 2,57%). Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigten sich bei den CD64⁺[%CD14⁺] signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (**p = 0,005) sowie zwischen den Gruppen C und

D (** $p = 0,004$). Bei den $CD206^+[\%CD14^+]$ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B und C ($*p = 0,028$).

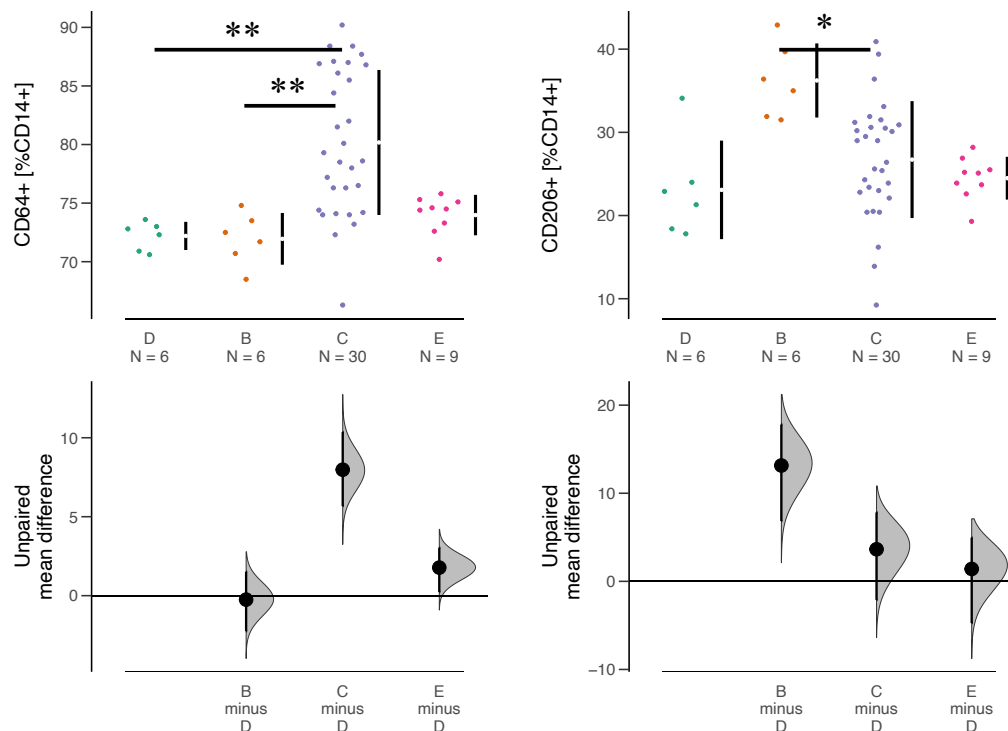


Abbildung 18: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung der Leukozyten und Monozyten in der Milz

B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung

Die Mittelwerte der $CD134^+[\%CD4^+]$ betragen in der Gruppe B 20,45% ($\pm 8,34\%$), in der Gruppe C 10,72% ($\pm 8,05\%$), in der Gruppe D 16,98% ($\pm 3,59\%$) und in der Gruppe E 11,57% ($\pm 6,47\%$). Die Mittelwerte der $CD69^+[\%CD4^+]$ betragen in der Gruppe B 22,73% ($\pm 5,58\%$), in der Gruppe C 34,22% ($\pm 9,88\%$), in der Gruppe D 25,37% ($\pm 3,18\%$) und in der Gruppe E 34,16% ($\pm 5,59\%$). Die Mittelwerte der $CD103^+[\%CD4^+]$ betragen in der Gruppe B 2,48% ($\pm 0,52\%$), in der Gruppe C 29,08% ($\pm 9,04\%$), in der Gruppe D 1,85% ($\pm 0,45\%$) und in der Gruppe E 27,62% ($\pm 6,86\%$). Die Mittelwerte der $Treg[\%CD4^+]$ betragen in der Gruppe B 2,19% ($\pm 1,54\%$), in der Gruppe C 0,80% ($\pm 1,10\%$), in der Gruppe D 1,29% ($\pm 0,51\%$) und in der Gruppe E 0,89% ($\pm 0,67\%$). Bei den $CD134^+[\%CD4^+]$ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den $CD69^+[\%CD4^+]$

zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (** p = 0,004), C und D (*p = 0,020) sowie D und E (**p = 0,004). Bei den CD103⁺[%CD4⁺] zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (**p < 0,001), B und E (**p = 0,00240), C und D (**p = 0,00087) sowie D und E (**p = 0,002). Bei den Treg[%CD4⁺] zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 19).

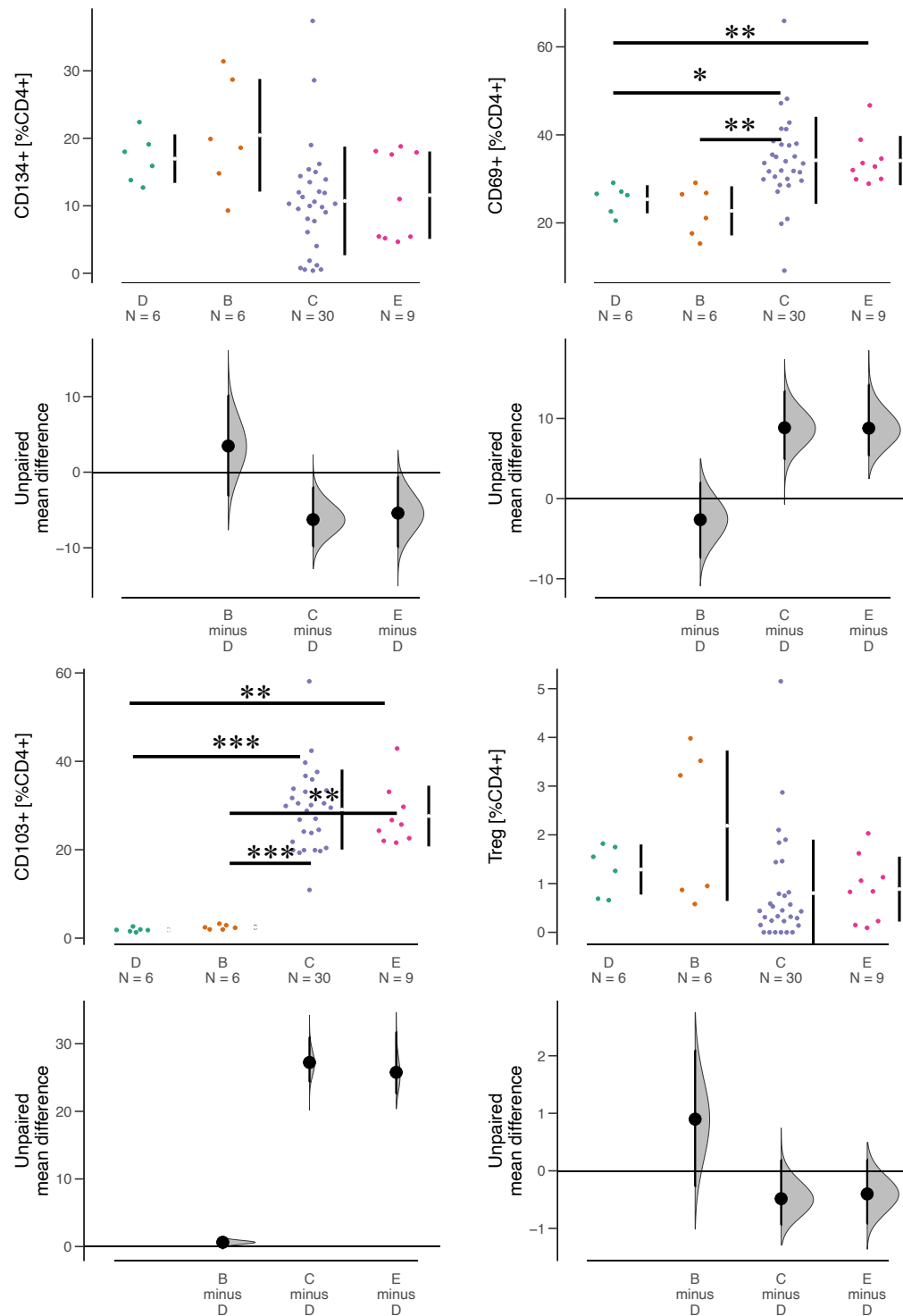


Abbildung 19: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung der CD4-T-Zellaktivierung in der Milz

B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung

Zytokine wurden aus jeweils 50 µl der lysierten Hautproben (siehe Kapitel 4.5.4) mithilfe der Mikropartikel-Array-Technologie (Bobrow et al., 2006) mit dem Luminex ProcartaPlex Immunoassay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) analysiert. Durch die Kombination verschiedener Beads konnten die gewünschten Zytokine gemessen werden.

Die Mittelwerte von MCP-3 betragen in der Gruppe B 680,17 pg/ml (\pm 625,85 pg/ml), in der Gruppe C 2658,60 pg/ml (\pm 3671,68 pg/ml), in der Gruppe D 104,33 pg/ml (\pm 143,13 pg/ml) und in der Gruppe E 2565,72 pg/ml (\pm 3285,38 pg/ml). Die Mittelwerte von TSLP betragen in der Gruppe B 74,42 pg/ml (\pm 23,10 pg/ml), in der Gruppe C 411,37 pg/ml (\pm 542,19 pg/ml), in der Gruppe D 22,00 pg/ml (\pm 13,01 pg/ml) und in der Gruppe E 47,61 pg/ml (\pm 26,10 pg/ml). Wie in Abbildung 20 ersichtlich, zeigten sich bei MCP-3 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen C und D (**p = 0,002) sowie D und E (**p = 0,008). Bei TSLP zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen C und D (**p = 0,002) sowie C und E (**p = 0,002).

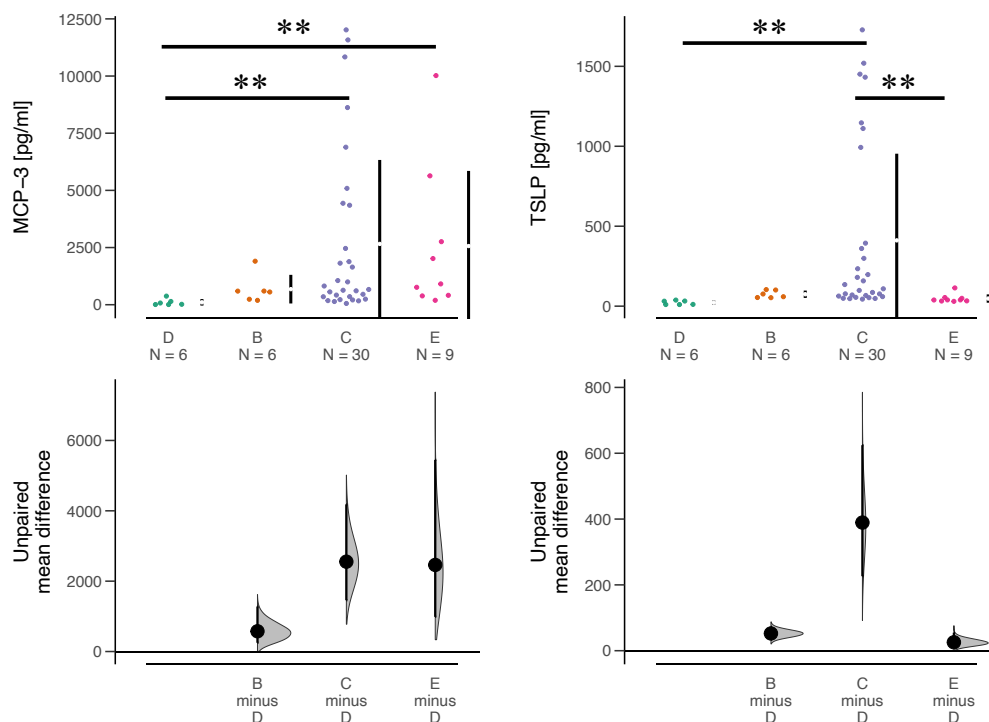


Abbildung 20: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung von MCP-3 und TSLP in der Haut

B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-

atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung.

Die Mittelwerte von IL-4 betragen in der Gruppe B 8,5 pg/ml (\pm 1,52 pg/ml), in der Gruppe C 29,67 pg/ml (\pm 22,20 pg/ml), in der Gruppe D 11,67 pg/ml (\pm 1,97 pg/ml) und in der Gruppe E 33,78 pg/ml (\pm 32,34 pg/ml). Die Mittelwerte von IL-12p70 betragen in der Gruppe B 8,17 pg/ml (\pm 1,47 pg/ml), in der Gruppe C 16,07 pg/ml (\pm 5,34 pg/ml), in der Gruppe D 9,33 pg/ml (\pm 7,21 pg/ml) und in der Gruppe E 15,39 pg/ml (\pm 7,21 pg/ml). Die Mittelwerte von IL-17A betragen in der Gruppe B 8,83 pg/ml (\pm 1,63 pg/ml), in der Gruppe C 15,97 pg/ml (\pm 3,68 pg/ml), in der Gruppe D 11,25 pg/ml (\pm 2,56 pg/ml) und in der Gruppe E 18,28 pg/ml (\pm 7,71 pg/ml). Wie in Abbildung 21 ersichtlich, zeigten sich bei IL-4 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (**p = 0,002) sowie C und D (**p = 0,008). Bei IL-12p70 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (**p = 0,003), zwischen den Gruppen B und E (*p = 0,041) sowie C und D (**p = 0,0072). Bei IL-17A zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C (**p = 0,003) sowie B und E (*p = 0,031).

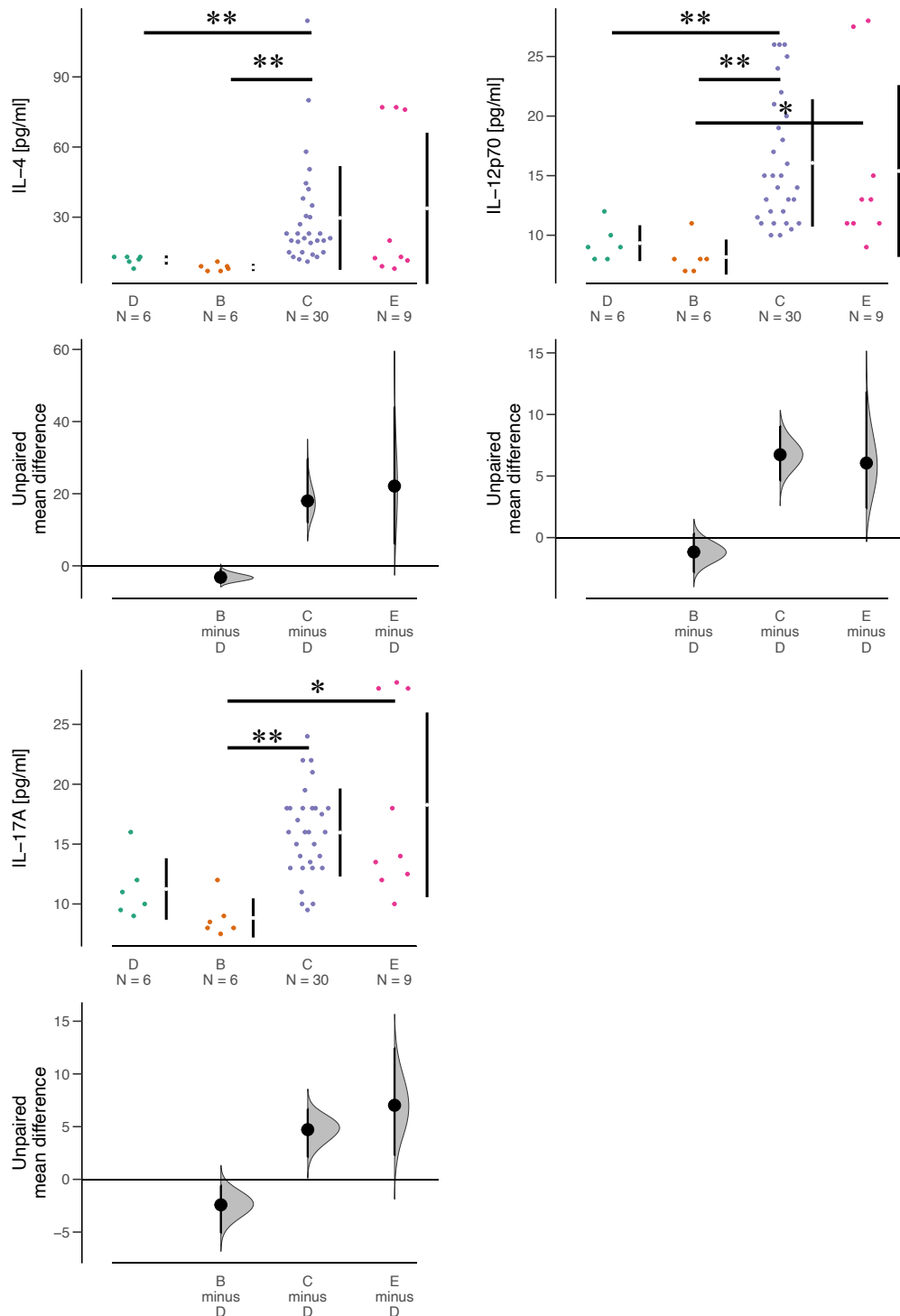


Abbildung 21: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung von IL-4, IL-12p70 und IL-17A in der Haut

B = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; C = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; D = Rekonstitution mit nicht-atopischer Spenderin, keine Sensitivierung; E = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, keine Sensitivierung

5.5 Effekte durch Prednisolon

Nachfolgend werden die Effekte einer Behandlung mit Prednisolon bei Rekonstitution mit PBMC von atopischen Spenderpatientinnen und Spenderpatienten erläutert. Hierbei wird die Kontrollgruppe (Rekonstitution mit PBMC von atopischen Spenderpatientinnen und Spenderpatienten und Sensitivierung mit DMSO) mit der behandelten Gruppe (Rekonstitution mit PBMC von atopischen Spenderpatientinnen und Spenderpatienten, Sensitivierung mit DMSO und Behandlung mit Prednisolon) verglichen. Das Medikament wurde in der Konzentration 1 mg/kg (Müller, 2017) oral verabreicht.

5.5.1 Klinischer Score

Um die klinischen Auswirkungen einer Behandlung mit Prednisolon zu erfassen, wurde ein klinischer Score erhoben. Die Tiere wurden an den in Abbildung 5 aufgeführten Tagen nach den Kriterien des Score Sheets in Tabelle 2 beurteilt. Für die statistische Auswertung wurden die Tagesscores jedes einzelnen Tieres summiert.

Die Kontrollgruppe (Sensitivierung mit DMSO) erzielte einen mittleren klinischen Score von 1,18 Punkten ($\pm 1,93$ Punkte), die behandelte Gruppe (Sensitivierung mit DMSO und Behandlung mit Prednisolon) erzielte einen mittleren klinischen Score von 1,41 Punkten ($\pm 1,94$ Punkte). Eine Behandlung mit Prednisolon führte nicht zu einer signifikanten Veränderung des klinischen Scores im Vergleich zu der mit DMSO sensitivierten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 22).

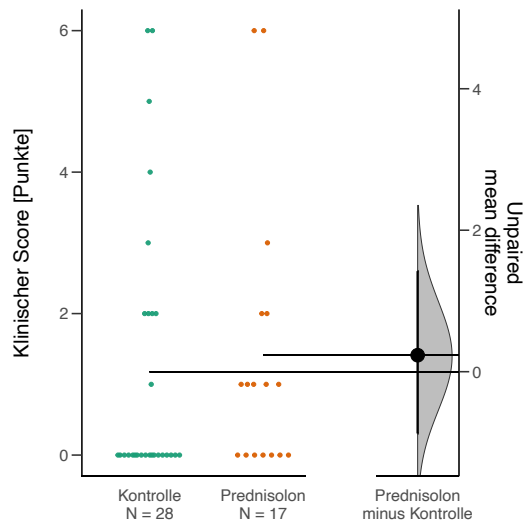


Abbildung 22: Gardner-Altman-Plot zur Darstellung des klinischen Scores: Vergleich der Kontrollgruppe und der mit Prednisolon behandelten Gruppe

Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg. Im linken Teil der Grafik werden alle einzelnen Datenpunkte in einem Schwarmplot dargestellt. Im rechten Teil der Grafik werden die Effektgrößen dargestellt. Der Nullpunkt der horizontalen Achse beschreibt den Mittelwert der Referenzgruppe (hier die unbehandelte Kontrollgruppe). Die Punkte zeigen die Unterschiede zwischen den Gruppen als Effektgröße. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Verteilung des erwarteten Fehlers für den Unterschied zwischen den Mittelwerten dar. Je gewölbter die Kurve, desto kleiner ist der Fehler. Der Balken durch den Punkt zeigt das Konfidenzintervall (95%) für den Unterschied zwischen den Mittelwerten. (Cumming, 2014; Ho et al., 2019)

5.5.2 Makroskopischer Hautscore

Am Tag des Versuchsendes wurde die Haut makroskopisch betrachtet und anhand der in Tabelle 3 aufgeführten Kriterien beurteilt. Die Punkte der Einzelkriterien wurden summiert. Pro Maus wurden jeweils die rechte und die linke Flanke ausgewertet.

Die Kontrollgruppe erzielte einen mittleren Hautscore von 1,32 Punkten ($\pm 1,19$ Punkte), die behandelte Gruppe von 0,35 Punkten ($\pm 0,61$ Punkte). Eine Behandlung mit Prednisolon führte zu einer signifikanten (**p = 0,003) Reduktion des Hautscores im Vergleich zu der mit DMSO sensitivierten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 23).

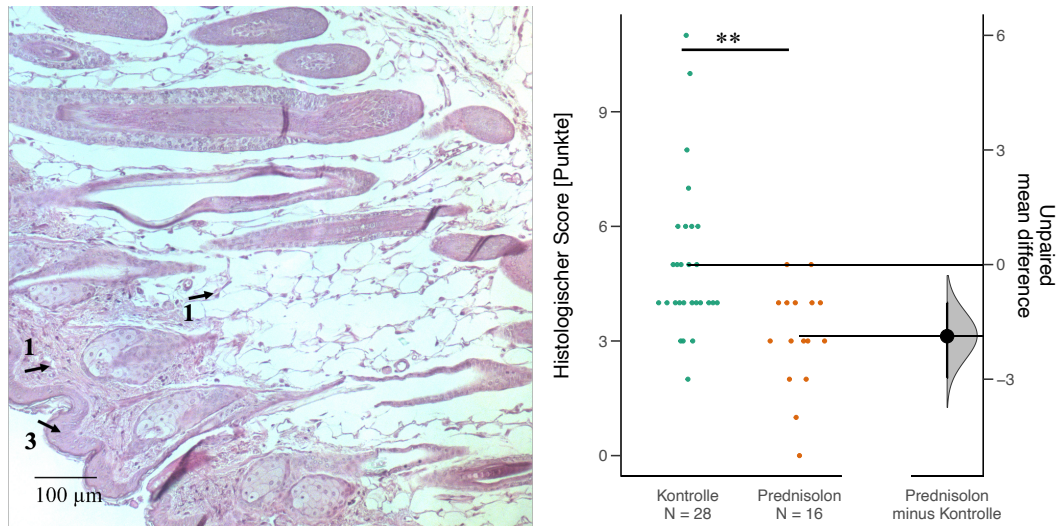


Abbildung 24: links: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg, Score 4, rechts: Gardner-Altman-Plot zur Darstellung des histologischen Scores: Vergleich der Kontrollgruppe und der mit Prednisolon behandelten Gruppe

1: Einstrom von Entzündungszellen, 3: Mehrschichtiges Epithel; Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg

5.5.4 Immunologisches Bild

Aus den Milzen der Mäuse wurden Zellsuspensionen hergestellt (siehe Kapitel 4.5.1.1), von denen jeweils 100 μ l mit 100 μ l FACS-Färbelösung angefärbt wurden (siehe Kapitel 4.5.1.2). Durch *Gates* der verschiedenen gemessenen Zellen konnten Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander differenziert werden (siehe Kapitel 4.5.1.3 und Kapitel 10.1).

Die Mittelwerte der CD64⁺[%CD14⁺] betragen in der Kontrollgruppe 76,41% (\pm 4,62%) und in der behandelten Gruppe 79,99% (\pm 3,98%). Die Mittelwerte der CD206⁺[%CD14⁺] betragen in der Kontrollgruppe 52,07% (\pm 16,79%) und in der behandelten Gruppe 75,15% (\pm 11,06%). Wie in Abbildung 25 dargestellt, zeigten sich signifikante Unterschiede bei den CD64⁺[%CD14⁺] (**p = 0,006) und den CD206⁺[%CD14⁺] (***) (***)p < 0,001).

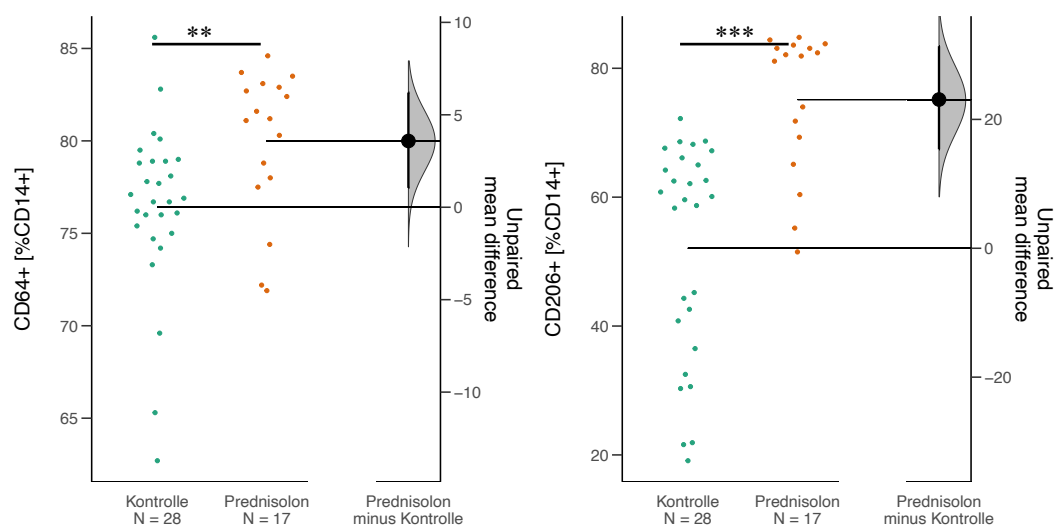


Abbildung 25: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung der Leukozyten und Monozyten in der Milz

Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO;
 Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO,
 Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg

Die Mittelwerte der CD134⁺[%CD4⁺] betragen in der Kontrollgruppe 10,78% (\pm 8,31%) und in der behandelten Gruppe 26,87% (\pm 6,90%). Die Mittelwerte der CD69⁺[%CD4⁺] betragen in der Kontrollgruppe 34,35% (\pm 10,20%) und in der behandelten Gruppe 29,18% (\pm 8,18%). Die Mittelwerte der CD103⁺[%CD4⁺] betragen in der Kontrollgruppe 29,59% (\pm 9,14%) und in der behandelten Gruppe

30,00% ($\pm 5,89\%$). Die Mittelwerte der Treg[%CD4⁺] betragen in der Kontrollgruppe 0,84% ($\pm 1,13\%$) und in der behandelten Gruppe 1,81% ($\pm 0,88\%$).

Bei den CD134⁺[%CD4⁺] (***) und den Treg[%CD4⁺] (***) zeigten sich signifikante Unterschiede; bei den CD69⁺[%CD4⁺] und den CD103⁺[%CD4⁺] zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 26).

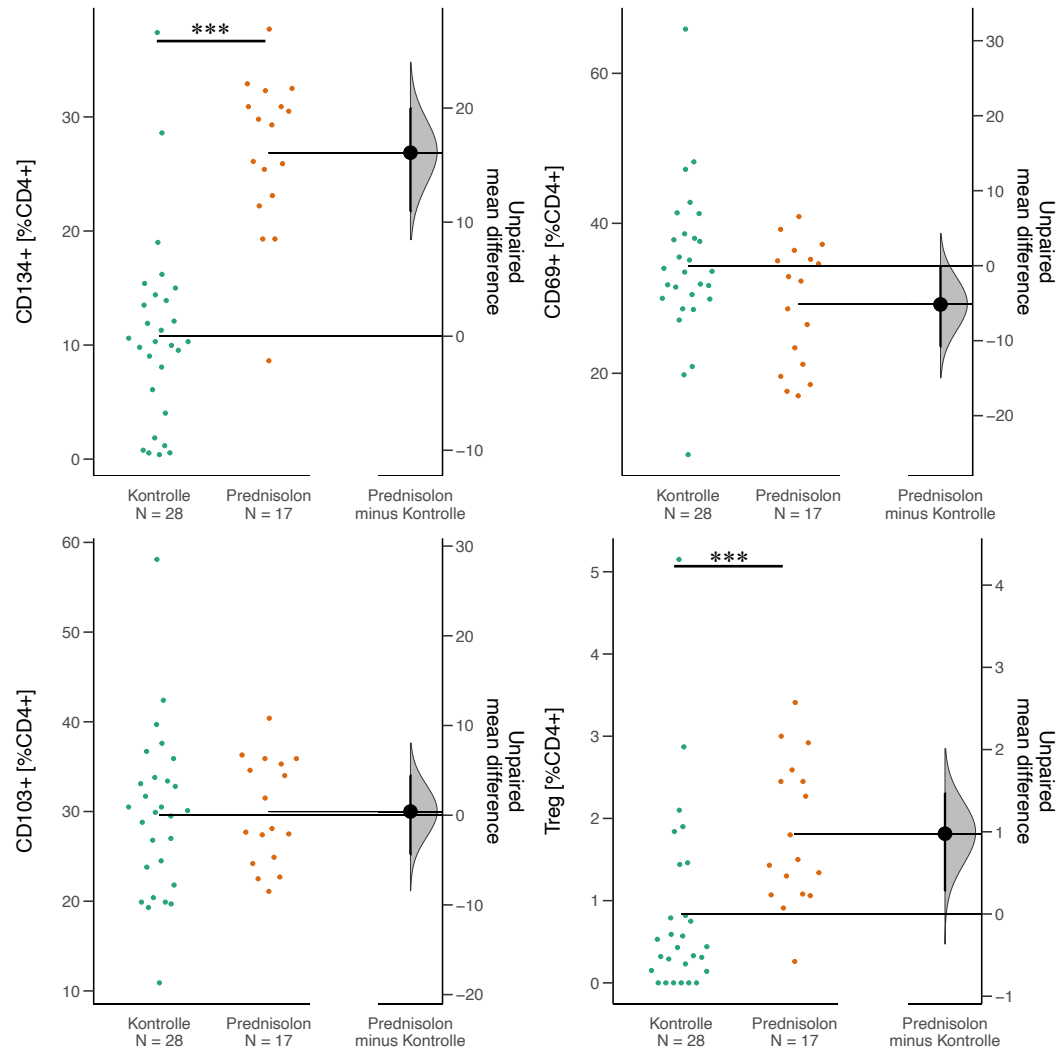


Abbildung 26: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung der CD4-T-Zellaktivierung in der Milz

Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO;
 Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO,
 Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg

Die Mittelwerte der IgD⁺[%CD19⁺CD27⁺] (B-Zellen mit Klassenwechsel) betragen in der Kontrollgruppe 36,27% ($\pm 6,64\%$) und in der behandelten Gruppe 27,46%

($\pm 6,24\%$). Die Mittelwerte der $\text{IgD}^+[\% \text{CD19}^+\text{CD27}^+]$ (B-Zellen ohne Klassenwechsel) betragen in der Kontrollgruppe $61,69\%$ ($\pm 7,22\%$) und in der behandelten Gruppe $70,64\%$ ($\pm 6,59\%$). Wie in Abbildung 27 ersichtlich, zeigten sich signifikante Unterschiede bei den $\text{IgD}^-[\% \text{CD19}^+\text{CD27}^+]$ ($***p < 0,001$) und den $\text{IgD}^+[\% \text{CD19}^+\text{CD27}^+]$ ($***p < 0,001$).

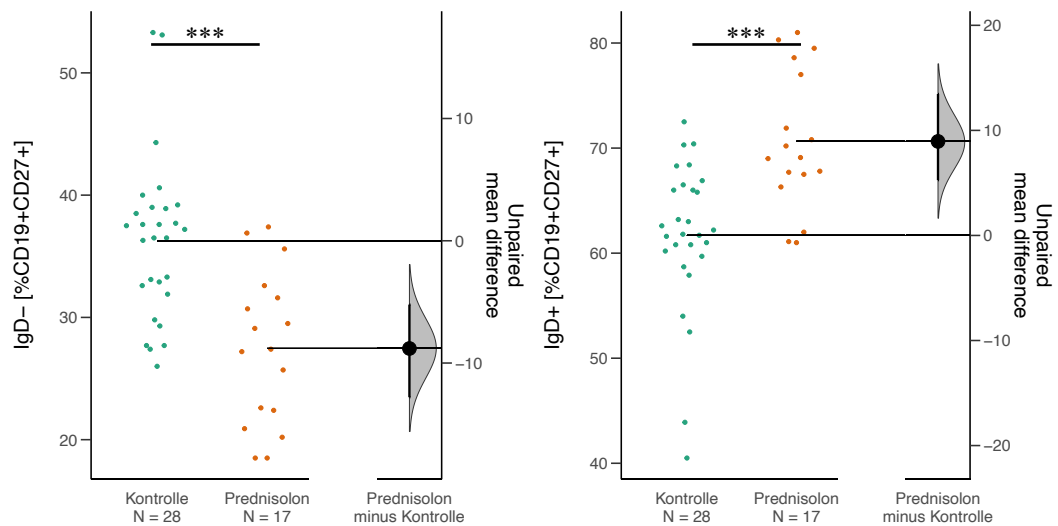


Abbildung 27: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung der B-Zellen in der Milz

Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO;
 Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO,
 Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg

Zytokine wurden aus jeweils 50 μl der lysierten Hautproben (siehe Kapitel 4.5.4) mithilfe der Mikropartikel-Array-Technologie (Bobrow et al., 2006) mit dem Luminex ProcartaPlex Immunoassay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) analysiert. Durch die Kombination verschiedener Beads konnten die gewünschten Zytokine gemessen werden.

Die Mittelwerte von MCP-3 betragen in der Kontrollgruppe $2005,70 \text{ pg/ml}$ ($\pm 2800,92 \text{ pg/ml}$) und in der behandelten Gruppe $294,88 \text{ pg/ml}$ ($\pm 468,61 \text{ pg/ml}$). Die Mittelwerte von TSLP betragen in der Kontrollgruppe $327,89 \text{ pg/ml}$ ($\pm 453,58 \text{ pg/ml}$) und in der behandelten Gruppe $82,41 \text{ pg/ml}$ ($\pm 66,85 \text{ pg/ml}$). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigten sich bei MCP-3 ($***p < 0,001$) und TSLP ($*p = 0,029$) (siehe Abbildung 28).

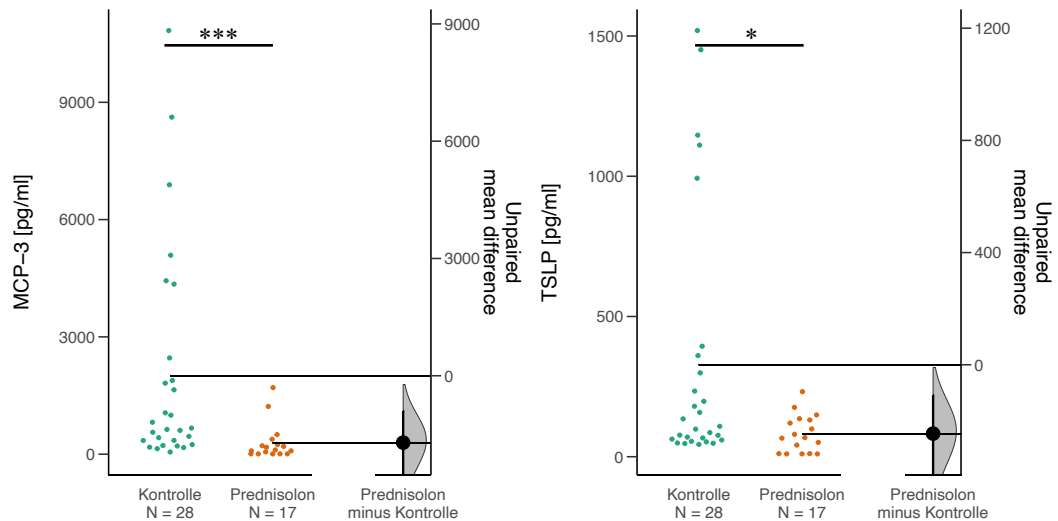


Abbildung 28: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung von MCP-3 und TSLP in der Haut

Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO;
 Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO,
 Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg

Die Mittelwerte von IL-4 betragen in der Kontrollgruppe 29,45 pg/ml ($\pm 22,98$ pg/ml) und in der behandelten Gruppe 47,50 pg/ml ($\pm 35,47$ pg/ml). Die Mittelwerte von IL-12p70 betragen in der Kontrollgruppe 16,04 pg/ml ($\pm 5,50$ pg/ml) und in der behandelten Gruppe 14,44 pg/ml ($\pm 5,69$ pg/ml). Die Mittelwerte von IL-17A betragen in der Kontrollgruppe 15,84 pg/ml ($\pm 3,78$ pg/ml) und in der behandelten Gruppe 17,35 pg/ml ($\pm 8,33$ pg/ml). Bei IL-4, IL-12p70 und IL-17A zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 29).

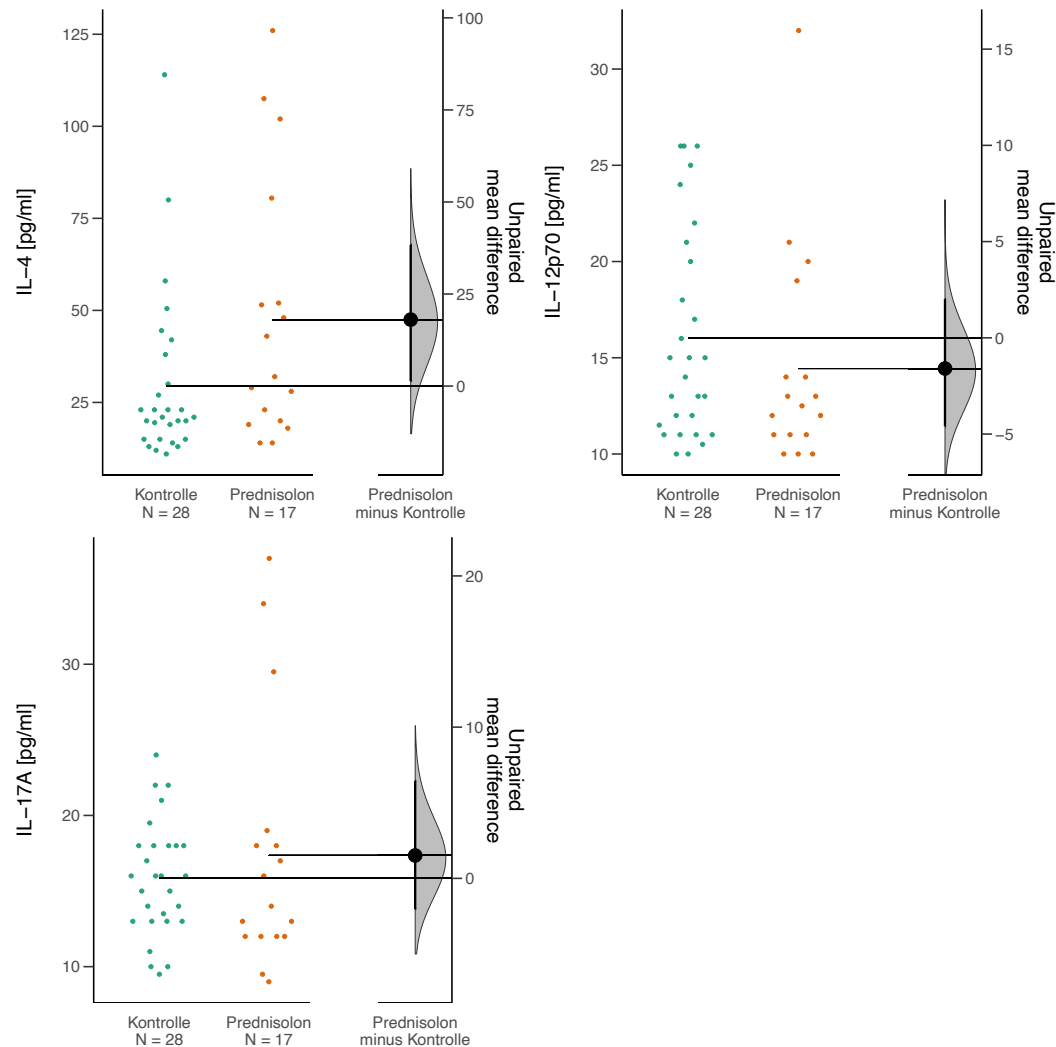


Abbildung 29: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung von IL-4, IL-12p70 und IL-17A in der Haut

Kontrolle = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO;
 Prednisolon = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO,
 Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg

Um die Effekte von Prednisolon weiter zu untersuchen, wurde eine oPLS-DA durchgeführt. Eine oPLS-DA dient der quantitativen Unterscheidung verschiedener Versuchsgruppen. Messwerte werden zur Erstellung eines Kalibrierungsmodells genutzt und algorithmisch mittels *cross validation* und *permutation test* evaluiert. Durch *permutation test* kann überprüft werden, ob die Einordnung der Beobachtungen in die beiden erstellten Gruppen geeigneter ist als beliebige andere Einordnungen (Golland et al., 2005). Lassen sich bei der *cross validation* getestete Beobachtungen in die richtigen Gruppen einordnen (Westerhuis et al., 2008), so kann das Modell als „robust“ bezeichnet werden und eignet sich zur

Unterscheidung der jeweiligen Gruppen. Zusätzlich liefert die *cross validation* die Möglichkeit, einen Wert zur Schätzung der Signifikanz des Modells zu berechnen (Triba et al., 2015). Die oPLS-DA ist also ein wenig komplexes Modell mit guter Vorhersagefähigkeit. Vorteile sind das effektive Entfernen unkorrelierter (orthogonaler) Variation in X und die Möglichkeit zur Interpretation korrelierter (prädiktiver) und unkorrelierter Variation (Trygg & Wold, 2002). Der Plot zeigt auf der x-Achse den prädiktiven Anteil der Scores (t) an, die das Ergebnis der oPLS Analyse darstellen; hier können die Gruppen voneinander differenziert werden. Auf der y-Achse wird der orthogonale Anteil der Scores (to) dargestellt; dieser zeigt die Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen.

Im Scores-Plot ist erkennbar, wie sehr sich die einzelnen Beobachtungen unterscheiden: Je weiter die Punkte auseinanderliegen, desto unterschiedlicher bzw. unkorrelierter sind die Werte. Mathematisch gesprochen trennt die oPLS Analyse korrelierte Variation von unkorrelierter Variation. *Inertia* = Maß für die totale Varianz in einem Datensatz; t_1 = prädiktive Komponente, beschreibt die Unterschiede zwischen zwei Gruppen, die orthogonalen Komponenten beschreiben die Variation in den Daten, die nicht mit Y korrelieren; $R^2X(\text{cum})$ = Summe der prädiktiven und orthogonalen Variation in X, die vom Modell erklärt wird; $R^2Y(\text{cum})$ = Summe der Variation in Y, die vom Modell erklärt wird; Q^2Y = Schätzung der Qualität der Vorhersage, je höher Q^2Y , desto besser die Qualität der Vorhersage; RMSEE = *Root mean squared error of estimation*. (Bylesjö et al., 2006; Cloarec et al., 2005; Trygg & Wold, 2002)

Als *Loading Markers* für die oPLS-DA dienten die mittels Durchflusszytometrie und Luminex gewonnenen Messwerte. Der klinische Score, der makroskopische Hautscore und der histologische Score wurden nicht als *Loading Markers* benutzt, da ein möglicher Einfluss subjektiver Einschätzungen hier nicht auszuschließen war. Die oPLS-DA für den Vergleich der Kontrollgruppe (Rekonstitution mit PBMC von atopischen Spenderpatientinnen und Spenderpatienten, Sensitivierung mit DMSO) und der behandelten Gruppe (Rekonstitution mit PBMC von atopischen Spenderpatientinnen und Spenderpatienten, Sensitivierung mit DMSO und Behandlung mit 1 mg/kg Prednisolon) findet sich in Abbildung 30.

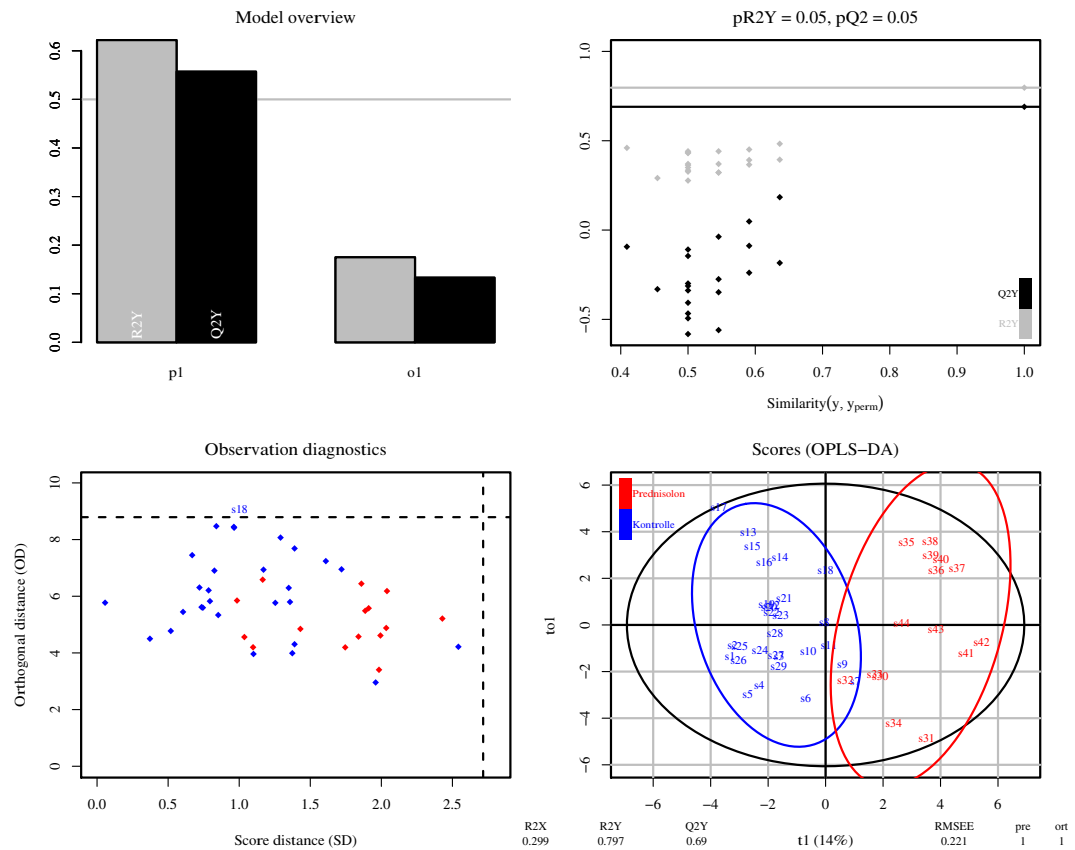


Abbildung 30: oPLS-DA, blau = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; rot = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg; links oben: Inertia Barplot: eine orthogonale Komponente scheint zur Beschreibung ausreichend; rechts oben: Signifikanzdiagnostik: pR^2Y und pQ^2Y des Modells verglichen mit den erzielten Y -Werten aus der random permutation; links unten: Extremwertdiagnostik; rechts unten: Score-Plot: $R^2X = 0,299$; $R^2Y = 0,797$; $Q^2Y = 0,690$; $t1 = 14\%$, $RMSEE = 0,221$



6 Diskussion

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

6.1 Ziele

Hier wird die Erreichung der o.g. Ziele im Zusammenhang mit relevanter Literatur diskutiert.

6.1.1 Immunprofilierung der Spenderinnen und Spender

Die hierarchische Clusterheatmap lässt erkennen, dass sich die einzelnen Personen in ihrem jeweiligen Immunprofil unterscheiden. Die Anteile an Th1[%CD4⁺CXCR3⁺]- und Th2[%CD4⁺CCR4⁺]-Zellen variierten sehr stark; dies entspricht den Erwartungen, da sich die Patientinnen und Patienten in unterschiedlichen Phasen einer chronisch-rezidivierenden AD befanden. Im akuten Stadium herrscht eine Th2-dominierte Immunantwort vor, im chronischen Stadium hingegen eine Th1-dominierte (Leung et al., 2004a).

Diese Untersuchungen zeigten also, dass die Patientinnen und Patienten, deren PBMC zur Rekonstitution für die Tierversuche verwendet wurden, einen Querschnitt der in dieser Arbeit immunprofilierten an AD erkrankten Personen darstellten und sich daher für die Testung im Mausmodell eigneten.

6.1.2 Rekonstitutionsgrad

Zur Überprüfung des erzielten Rekonstitutionsgrades wurde der Gesamtanteil der humanen Zellen mit dem Marker hCD45 angefärbt. Wie bereits in anderen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe war der Rekonstitutionsgrad sehr variabel und konnte keiner speziellen Behandlungsgruppe zugeordnet werden, insgesamt lag der Rekonstitutionsgrad im Mittel jedoch höher als in vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe, wo er zwischen 1,5% und 6,7% lag (Nolte et al., 2013a; Nolte et al., 2013b). In dieser Arbeit wurde der Rekonstitutionsgrad am Tag des Versuchsendes (Tag 22) evaluiert. Bei Hesselton et al. (1993), die den Rekonstitutionsgrad anhand von gemessenem IL-2 beurteilten, erreichte dieser erst nach 4-5 Wochen Höchstwerte. Möglicherweise sollte also ein länger andauerndes Versuchsprotokoll zur Erhöhung des Rekonstitutionsgrades in Betracht gezogen werden, wobei die Tiere allerdings bereits nach 40 Tagen eine letale xenogene GVHD entwickeln könnten (Ali et al., 2012; Shultz et al., 2012; Walsh et al., 2017). Eine weitere

Möglichkeit zur Erhöhung des Rekonstitutionsgrades wäre eine Erhöhung der injizierten Zellzahl. In dieser Arbeit wurden jeder Maus 4×10^6 Zellen intravenös injiziert, in anderen Studien (Pearson et al., 2008) wurden 20×10^6 Zellen für eine Rekonstitution verwendet. Dafür wären jedoch entweder deutlich mehr als die hier verwendeten 60 ml Blut pro Person oder eine Verringerung der Tierzahl pro Versuch nötig.

6.1.3 Entwicklung eines Tiermodells für atopische Dermatitis

Die Auswirkungen einer Sensitivierung mit DMSO auf nicht-rekonstituierte Mäuse, auf mit PBMC einer nicht-atopischen Spenderin rekonstituierte Mäuse und auf mit PBMC von atopischen Spenderinnen und Spendern rekonstituierte Mäuse wurden verglichen. Beim klinischen Score zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Beim makroskopischen Hautscore hingegen zeigten die Tiere, die mit PBMC von atopischen Patientinnen und Patienten rekonstituiert wurden und zusätzlich mit DMSO sensitiviert wurden, den höchsten Score in Form von Dehydratation und blutigen Verkrustungen. Beim histologischen Score wies diese Gruppe ebenfalls die höchsten Werte auf. Hier zeigten sich ein Einstrom von Entzündungszellen, Verhornung und ein mehrschichtiges Epithel. Ähnliche histologische Veränderungen konnten in Studien, in denen Oxazolone (Man et al., 2008; Nolte et al., 2013a; Pail et al., 2019) oder Trinitrochlorbenzen (Matsumoto et al., 2004) zur Sensitivierung verwendet wurde, bereits nachgewiesen werden.

Nicht rekonstituierte Tiere zeigten dagegen unabhängig von einer Sensitivierung mit DMSO keine AD-ähnlichen Symptome, d.h. die Entwicklung einer AD ist abhängig von der Anwesenheit humaner PBMC. Eine alleinige Rekonstitution mit menschlichen PBMC schien jedoch ebenfalls nicht ausreichend zur Entwicklung von Symptomen einer AD: Bei Rekonstitution mit PBMC von atopischen Spenderinnen und Spendern ohne Sensitivierung zeigte sich keine spontane Entwicklung von Symptomen. Die zusätzliche Irritation der Haut durch das Auftragen von DMSO war nötig, um Symptome hervorzurufen. Bei Rekonstitution mit PBMC einer nicht-atopischen Spenderin zeigte sich auch mit Sensitivierung durch DMSO keine Entwicklung von AD-ähnlichen Symptomen. Dies deutet darauf hin, dass der immunologische Hintergrund der zur Rekonstitution verwendeten Zellen von Bedeutung ist, um eine immunologische Antwort zu

provozieren, die zur Entwicklung eines AD-typischen Phänotyps führt. Die Tatsache, dass das Modell bei Spendern bzw. Spenderinnen mit inflammatorischem Hintergrund deutlichere Ergebnisse zeigt, steht in Einklang mit im *Colitis Ulcerosa* Modell in NOD Scid IL2R γ Chain^{null} Mäusen gewonnenen Ergebnissen (Palamides et al., 2016).

Obwohl hier beim klinischen Score keine signifikanten Unterschiede auftraten, zeigen die Ergebnisse also, dass eine Rekonstitution mit humanen PBMC einer an AD erkrankten Person und zusätzlich eine Sensitivierung mit DMSO nötig sind, um ein einer AD ähnelndes Hautbild hervorzurufen. Bei einigen wenigen Tieren schien jedoch auch bereits ein Scheren und die Benutzung einer Enthaarungscreme leichte Hautirritationen auszulösen.

Somit konnte mit dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsprotokoll ein stabiles, reproduzierbares Modell für AD an NOD Scid IL2R γ Chain^{null} Mäusen ohne große Verluste durch Letalität entwickelt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in anderen Arbeiten bspw. durch Sensitivierung mit Oxazolone oder Trinitrochlorbenzen erzielt werden (Man et al., 2008; Matsumoto et al., 2004; Nolte et al., 2013a; Pail et al., 2019; Tsukumo et al., 2010).

6.1.4 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge

Zur Charakterisierung der immunologischen Vorgänge wurden verschiedene humane Leukozytenpopulationen gemessen. Die Anteile der CD64⁺[%CD14⁺] Zellen und CD206⁺[%CD14⁺] Zellen waren in der Gruppe, die mit PBMC von atopischen Spenderinnen bzw. Spendern rekonstituiert wurde und mit DMSO sensitiviert wurde, signifikant erhöht. Dies spricht für eine Aktivierung der proinflammatorischen Monozyten, was eine Entzündung anzeigt. Diese wandern aus ins Gewebe, wo sie sich zu Gewebe-spezifischen Makrophagen differenzieren und bei AD in akut und chronisch entzündeter Haut anreichern (Kasraie & Werfel, 2013).

Weiterhin waren die Anteile an CD69⁺[%CD4⁺] Zellen und CD103⁺[%CD4⁺] Zellen in der Gruppe, die mit PBMC von atopischen Spenderinnen bzw. Spendern rekonstituiert und mit DMSO sensitiviert wurde, signifikant erhöht. T-Zellen an barrierebildenden Oberflächen, wie dem Magen-Darm-Trakt, den Lungen und der Haut, sind generell gekennzeichnet durch die Expression von CD103 und CD69

(Klicznik et al., 2019). Auch eine Studie von Watanabe et al. (2015) kam zu ähnlichen Ergebnissen wie diese Arbeit: Hier wurden Mäuse mit humanen PBMC rekonstituiert und zusätzlich wurde den Tieren humane Haut transplantiert; nach Behandlung mit Alemtuzumab kam es in der Haut zu einer vermehrten Expression von CD69 und darauf folgend zu einer vermehrten Expression von CD103. Bemerkenswert ist, dass in dieser Arbeit erhöhte Anteile an CD69⁺[%CD4⁺] Zellen und CD103⁺[%CD4⁺] Zellen in der Milz und nicht direkt in der Haut gemessen wurden. Keine Unterschiede zeigten sich hingegen bei den Anteilen an CD134⁺[%CD4⁺] und Treg[%CD4⁺].

Darüber hinaus wurden inflammatorische Zytokine und humane Interleukine untersucht, um die gewonnenen Erkenntnisse weiter zu stützen: Die Werte von MCP-3, IL-4, IL-12p70 und IL-17A waren in den Gruppen, die mit PBMC von atopischen Personen rekonstituiert wurden, signifikant erhöht. Die TSLP-Werte dagegen waren nur in der Gruppe, die mit PBMC von atopischen Spenderinnen bzw. Spendern rekonstituiert wurde und mit DMSO sensitiviert wurde, signifikant erhöht.

Bei MCP-3 konnten zwar in der Haut von AD Patientinnen und Patienten keine Unterschiede zu nicht-atopischen Personen festgestellt werden (Yawalkar et al., 1999), aber bei Studien im Mausmodell konnten ebenso wie in dieser Arbeit erhöhte MCP-3 Werte in entzündeter Haut nachgewiesen werden, wobei die Bedeutung bisher nicht abschließend geklärt ist (Kaminuma et al., 2018). In dieser Arbeit konnte MCP-3 als eindeutiger inflammatorischer Marker identifiziert werden, der bereits bei Rekonstitution mit PBMC von atopischen Patientinnen und Patienten unabhängig von einer Sensitivierung erhöht war.

Auch TSLP konnte hier als inflammatorischer Marker bestätigt werden, wenn auch die Erhöhung bei Rekonstitution mit PBMC von atopischen Patientinnen und Patienten weniger deutlich ausfiel als bei MCP-3. Allerdings zeigte sich eine signifikante Erhöhung durch eine zusätzliche Sensitivierung mit DMSO. Dies stimmt überein mit Ergebnissen aus der Literatur (Yoon et al., 2015). TSLP triggert juckreizbedingtes Kratzen und die Entwicklung des typischen klinischen Bildes einer AD (Wang & Liu, 2009) und wird bei AD vermehrt in der Epidermis

exprimiert (Nakajima et al., 2020), auch im Mausmodell (Yoon et al., 2015). Es fördert bspw. auch die T-Zelldifferenzierung (Leung et al., 2004a).

In den Gruppen, die mit PBMC von atopischen Personen rekonstituiert wurden, war IL-4 ebenfalls signifikant erhöht. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur: AD ist charakterisiert durch hohe Konzentrationen von IL-4 (Wierenga et al., 1991), was daher bereits in vielen Studien als Marker für AD diente (Ahn et al., 2020; Callewaert et al., 2020; Kamijo et al., 2020; Tanaka et al., 2001; Tazawa et al., 2004) und auch in ex vivo Studien erhöht war (Crack et al., 2011). Grund für diese Erhöhungen ist, dass IL-4 die Th2-Zellentwicklung fördert (Opal & DePalo, 2000).

IL-12p70 zeigte ebenso eine Erhöhung der Werte in den Gruppen, die mit PBMC von atopischen Personen rekonstituiert wurden. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass hohe Werte von IL-12p70 für eine systemische Entzündung sprechen, da dieses Interleukin bei AD auch in nicht-läsionalen Hautstellen bereits nachgewiesen wurde (Brunner et al., 2017); außerdem kann IL-12 die IFN- γ -Produktion anregen (Ma & Trinchieri, 2001).

Auch IL-17A gilt als wichtiger Faktor der Pathogenese von AD (Souwer et al., 2010), der vermehrt während der akuten (Toda et al., 2003) und weniger während der chronischen (Nograles et al., 2009) Phase der Krankheit nachgewiesen werden kann. Die höchsten Werte werden bei Patienten mit hochgradiger AD gemessen (Koga et al., 2008). In dieser Arbeit waren die Werte von IL-17A in den Gruppen, die mit PBMC von atopischen Personen rekonstituiert wurden, signifikant erhöht, was dafür spricht, dass das hier entwickelte Mausmodell aufgrund der geringen Krankheitsdauer der Tiere eher der akuten Phase einer AD zuzuordnen ist.

Zusammenfassend lässt sich also erkennen, dass MCP-3 und TSLP als inflammatorische Marker identifiziert werden konnten, die bereits bei Rekonstitution mit PBMC von atopischen Patientinnen und Patienten unabhängig von einer Sensitivierung erhöht waren. Außerdem wiesen auch die humanen Interleukine IL-4, IL-12p70 und IL-17A bereits durch eine atopische Krankheitsgeschichte der Spender bzw. Spenderinnen im Mausmodell erhöhte Werte auf.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sich das in dieser Arbeit entwickelte Modell durch eine Erhöhung der aktivierten Monozyten und T-Zellen sowie eine Erhöhung der gemessenen inflammatorischen Zytokine und humanen Interleukine auszeichnet.

6.1.5 Effekte durch Prednisolon

Prednisolon wurde den Tieren in einer Konzentration von 1 mg/kg oral verabreicht. Die behandelte Gruppe wurde mit PBMC von atopischen Personen rekonstituiert, mit DMSO sensitiviert und im Anschluss verglichen mit der Gruppe, die mit PBMC von atopischen Spenderinnen bzw. Spendern rekonstituiert wurde und mit DMSO sensitiviert wurde. Prednisolon wurde ausgewählt, da es sich bei diesem topisch oder systemisch anwendbaren Kortikosteroid trotz seiner Nebenwirkungen um eine der möglichen Standardbehandlungen bei AD mittlerer bis schwerer Ausprägung handelt (Schmitt et al., 2017; Schmitt et al., 2010; Y. K. Tay et al., 2016).

Beim klinischen Score führte eine Behandlung mit Prednisolon nicht zu Veränderungen, der makroskopische Hautscore und der histologische Score konnten hingegen signifikant verringert werden. Diese ausbleibende Verringerung des klinischen Scores lässt sich damit erklären, dass systemisch verabreichte Kortikosteroide mögliche Nebenwirkungen zeigen können (Akdis et al., 2006), die somit bspw. durch Gewichtsabnahmen zu einer Erhöhung des klinischen Scores beitragen können. In anderen Studien zeigten sich im Mausmodell (Kagawa et al., 2010; Schneider et al., 2009; Sugiyama et al., 2010) und beim Menschen (Schmitt et al., 2017) eine verringerte Hautsymptomatik durch Behandlung mit Prednisolon, was mit den Ergebnissen des makroskopischen Hautscores und des histologischen Scores in dieser Arbeit übereinstimmt.

Auch im immunologischen Bild zeigten sich Unterschiede zwischen der mit Prednisolon behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe:

Die Anteile an CD64⁺[%CD14⁺] Zellen und CD206⁺[%CD14⁺] Zellen waren bei der mit Prednisolon behandelten Gruppe signifikant erhöht. Prednisolon führte also zu einer höheren Aktivierung von Monozyten im Vergleich zur mit DMSO sensitivierten Kontrollgruppe. Diese setzen eine Auflösung der Entzündung und Wundheilungsprozesse wie Hämostase, Inflammation, Proliferation, Angiogenese, Reepithelialisierung und *Remodeling* in Gang (Delavary et al., 2011; Jodeleit et al.,

2019; Jodeleit et al., 2020a; Lucas et al., 2010), was möglicherweise durch Prednisolon beschleunigt werden könnte. Daneben führt IL-4 zu einer erhöhten Proliferation von Makrophagen, und zwar einerseits des unterdrückenden und andererseits ebenfalls des *Remodeling* Phänotyps (Jenkins et al., 2013). Da in der mit Prednisolon behandelten Gruppe auch die IL-4 Werte erhöht waren, könnte dies eine weitere Erklärung für die erhöhten Anteile an CD64⁺[%CD14⁺] Zellen und CD206⁺[%CD14⁺] Zellen darstellen.

Bei den Anteilen an CD69⁺[%CD4⁺] und CD103⁺[%CD4⁺] zeigten sich hier zwar keine signifikanten Unterschiede; die Anteile an CD134⁺[%CD4⁺] Zellen waren bei der mit Prednisolon behandelten Gruppe dagegen signifikant erhöht. CD134 scheint eine ambivalente Rolle zu haben: Einerseits wird es exprimiert auf aktivierten T-Zellen, Gedächtnis T-Zellen und Treg (Calderhead et al., 1993; Croft et al., 2009; So et al., 2008; Takeda et al., 2004), wodurch es die Immunantwort fördern kann (Webb et al., 2016) durch Signaltransmitterfunktionen in der T-/B-Zellinteraktion (Calderhead et al., 1993); andererseits kann CD134 eine bestehende T-Zell Immuntoleranz „brechen“ (Bansal-Pakala et al., 2001; Webb et al., 2016). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie bspw. Asthma konnte bereits gezeigt werden, dass CD134 vermittelte Signalwege entscheidend zur Pathogenese beitragen (Lei et al., 2018). Auch die Anteile an Treg[%CD4⁺] waren bei einer Behandlung mit Prednisolon signifikant erhöht. Dies steht in Einklang mit Studien, die *in vitro* eine stimulierende Wirkung von Prednisolon auf Treg nachweisen konnten (Janyst et al., 2020).

Weiterhin verringerte sich durch eine Behandlung mit Prednisolon der Anteil an IgD⁺[%CD19⁺CD27⁺] Zellen (*affinity matured* B-Zellen, mit Klassenwechsel), wogegen sich der Anteil an IgD⁺[%CD19⁺CD27⁺] Zellen (*early memory* B-Zellen, ohne Klassenwechsel) erhöhte. Da B-Zellen durch T-Helferzellen aktiviert werden (Abos et al., 2020), könnte eine Abnahme des Anteils der T-Helferzellen in Zusammenhang mit der Medikamentengabe eine Verringerung der B-Zellen mit Klassenwechsel bedingen (de Vries et al., 1993; Purkerson & Isakson, 1992). Auch CD134 übt einen Einfluss auf B-Zellen aus durch die oben beschriebene T-/B-Zellinteraktion (Calderhead et al., 1993).

Zusätzlich wurden auch hier inflammatorische Zytokine und humane Interleukine untersucht. Durch eine Behandlung mit Prednisolon verringerten sich die Werte von MCP-3 und TSLP signifikant. Da MCP-3 und TSLP als eindeutige inflammatorische Marker identifiziert werden konnten, spricht eine Reduzierung der Werte durch eine Prednisolongabe dafür, dass auch die Entzündung in der Haut reduziert wurde. Dies stimmt auch mit anderen Studien überein, in denen durch Behandlung mit Prednisolon im Mausmodell TSLP Werte gesenkt werden konnten (Yoon et al., 2015).

Bei den Werten von IL-4, IL-12p70 und IL-17A zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede. Trotzdem war eine Verringerung der IL-12p70 Werte durch eine Gabe von Prednisolon erkennbar. Da IL-12 Zeichen einer systemischen Entzündung ist (Brunner et al., 2017), spricht auch dies dafür, dass durch Prednisolon die Entzündung reduziert werden konnte. Die IL-4 Werte hingegen stiegen durch eine Prednisolongabe an. Dies stimmt überein mit den erhöhten Anteilen an Makrophagen, denn IL-4 führt zu einer vermehrten Proliferation von Makrophagen (Jenkins et al., 2013).

Darüber hinaus konnten die beschriebenen Ergebnisse durch eine oPLS-DA bestätigt werden. Die mittels Durchflusszytometrie und Luminex gewonnenen Messwerte wurden hier für die Differenzierung von behandelten und nicht behandelten Versuchstiergruppen eingesetzt. Der klinische Score, Hautscore und histologische Score wurden nicht als *Loading Markers* verwendet, da ein möglicher Einfluss subjektiver Einschätzungen nicht auszuschließen war.

Die hohen R^2Y und Q^2Y -Werte der oPLS-DA sprechen für eine gute Qualität der Vorhersage im Modell. Eine gute Unterscheidbarkeit der Gruppe, die mit 1 mg/kg Prednisolon behandelt wurde, von der unbehandelten, nur mit DMSO sensitivierten Kontrollgruppe, die gut im Modell der oPLS-DA erkennbar ist, ist somit anzunehmen. Das heißt, dass sich die Werte zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe hinreichend unterscheiden und dass sich daraus schließen lässt, dass Prednisolon im Tiermodell einen guten Effekt zeigen könnte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit also, dass eine Therapie mit Prednisolon zu einer Verringerung des klinischen Bildes einer AD und zu einer

Verminderung der mit Entzündungsreaktionen einhergehenden gemessenen Zellpopulationen sowie inflammatorischen Zytokine und humanen Interleukine führen könnte.

6.2 Vor- und Nachteile des Modells

Der größte Vorteil des Modells ist seine Variabilität. Konventionelle Mausmodelle können eine Variabilität des Immunsystems verschiedener Patienten nicht abbilden, wodurch nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit von präklinischen auf spätere klinische Studien gewährleistet werden kann (Jodeleit et al., 2019; Zadeh-Khorasani et al., 2013). Im Gegensatz zu Versuchen mit genetisch standardisierten Mäusen, stellt dieses Modell die immunologische Situation im Patienten genauer dar und könnte so eine Übertragbarkeit auf klinische Studien erhöhen (Jodeleit et al., 2020b). Da durch eine Rekonstitution Zielmoleküle, die auf humanen PBMC exprimiert werden, adressiert werden können, sind somit auch weniger Studien an nicht-humanen Primaten nötig. Zudem könnte ein möglicher Therapieerfolg beim Einzelpatienten besser eingeschätzt werden, was dem Wunsch nach phasengerechter Therapie näherkommen kann.

Jedoch ist die Variabilität dieses Systems gleichzeitig auch sein größter Nachteil: Für aussagekräftige Ergebnisse werden hohe Tierzahlen benötigt, da Tiere mit PBMC von mehreren Spendern und Spenderinnen rekonstituiert werden müssen. Dies verursacht neben der Tierschutzproblematik aufgrund des hohen Tierversbrauchs auch hohe Material- und Personalkosten und ist zudem sehr zeitaufwändig. Jedoch waren die Therapieeffekte durch Prednisolon in den verschiedenen Versuchen reproduzierbar, was dafür spricht, dass derartige Medikamente trotz großer Variabilität des Systems durchaus zur Erzielung aussagekräftiger Ergebnisse in einem solchen Tiermodell getestet werden könnten.

Eine weitere Schwäche des Tiermodells ist die potenzielle Gefahr der Ausbildung einer letalen xenogenen GVHD (Shultz et al., 2012; Walsh et al., 2017). Dadurch besteht nur ein relativ kurzes Zeitfenster für Experimente, was die Vergleichbarkeit mit einer oft über Jahrzehnte oder sogar lebenslang andauernden chronischen Krankheit wie AD deutlich einschränkt. Auch wiederkehrende Krankheitsschübe sind in einem solchen nur wenige Wochen lang beobachtbaren Modell nicht darstellbar. In dieser Arbeit trat, womöglich aufgrund der relativ kurzen Zeitdauer

der Experimente von 22 Tagen, kein Fall von GVHD auf. Mögliche Anzeichen einer solchen Reaktion können struppiges Fell, Gewichtsverluste und spezifische Abstoßungsreaktionen in der Haut sein. Trotzdem könnte ein über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhaltendes Modell den tatsächlichen Ablauf einer chronisch-rezidivierenden AD vermutlich besser veranschaulichen. Fraglich ist allerdings, ob es tierschutzrechtlich vertretbar wäre, über mehrere Wochen oder Monate andauernde phänotypisch ausgeprägte Schübe einer AD in einem Mausmodell zu beobachten.

6.3 Ausblick

Obwohl bereits zahlreiche Subtypen inflammatorischer Zellen in dieser Arbeit untersucht wurden, sollte das durchflusszytometrische *Panel* noch erweitert werden, um zusätzliche Zelltypen, wie zum Beispiel Mastzellen, Eosinophile und Basophile, die bei AD eine große Rolle spielen, genauer untersuchen zu können.

Ferner würde ein über eine längere Zeit andauerndes Modell dem Charakter einer chronisch-rezidivierenden Krankheit genauer entsprechen, ist aber aufgrund der Tierschutzproblematik eher nicht durchführbar.

Als Weiterführung dieses Projektes wäre es außerdem wünschenswert, eine topische Medikamentenapplikation in dem in dieser Arbeit entwickelten Modell zu testen. Gerade für Patienten mit AD ist eine lokale Anwendung von Cremes und Salben gegenüber einer systemischen Medikation, welche in diesem Modell getestet wurde, vorteilhafter. Nachteile systemischer Applikationen können mögliche Nebenwirkungen sein, die sich auf den gesamten Körper beziehen können und daher für viele Patienten, die oft noch jung sind und mitten im (Berufs-)Leben stehen, nicht akzeptabel sind. Zusätzlich scheint es möglich, dieses Modell auch zur Testung weiterer Medikamente zu nutzen.

7 Zusammenfassung

AD als eine nicht infektiöse, chronische oder chronisch-rezidivierende Hauterkrankung gilt vor allem in Industrienationen und Schwellenländern als eine der am häufigsten auftretenden chronischen Erkrankungen. Hauptsymptome sind Juckreiz und Ekzeme; besonders betroffen sind viele Kinder. Die Pathogenese der Erkrankung ist bislang nicht vollständig geklärt.

Der in dieser Arbeit verwendete Mausstamm NOD Scid IL2R γ Chain^{null} kann durch Rekonstitution mit humanen PBMC das Immunsystem des jeweiligen Patienten bzw. der jeweiligen Patientin teilweise abbilden. Hier wurde versucht, ein Modell für AD in diesen Mäusen durch Rekonstitution mit PBMC von an AD erkrankten Personen und anschließende Sensitivierung mit DMSO zu entwickeln. Es wurden die Auswirkungen auf den klinischen Score, den makroskopischen Hautscore, den histologischen Score, verschiedene humane Leukozytenpopulationen sowie inflammatorische Zytokine und humane Interleukine evaluiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Rekonstitution mit humanen PBMC einer an AD erkrankten Person und zusätzlich eine Sensitivierung mit DMSO nötig sind, um ein einer AD ähnelndes Hautbild hervorzurufen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsprotokoll konnte ein stabiles, reproduzierbares Modell für AD an NOD Scid IL2R γ Chain^{null} Mäusen entwickelt werden, das sich durch eine Erhöhung der aktivierten Monozyten und T-Zellen sowie eine Erhöhung der gemessenen Zytokine MCP-3, TSLP, IL-4, IL-12p70 und IL-17A auszeichnet.

Zur Validierung des Modells wurde eine Therapie mit 1 mg/kg Prednisolon getestet und die Wirkung von Prednisolon (1 mg/kg) auf die o.g. Parameter wurde untersucht. Eine Prednisolontherapie führte zu einer Verringerung des klinischen und histologischen Bildes der AD und einer Veränderung der gemessenen Zellpopulationen sowie Zytokine. Eine oPLS-DA der experimentellen Daten zeigte zudem, dass eine Behandlung mit Prednisolon eine gute Wirksamkeit im Tiermodell erzielen könnte.

Des Weiteren wurden Immunprofilierungen von AD Patienten durchgeführt, die zeigten, dass sich trotz der großen Variabilität der Immunprofile ein reproduzierbares Mausmodell erstellen ließ.

Durch die Kombination von Immunprofilierung und dem hier entwickelten Tiermodell könnten präklinische Studien eine höhere Aussagekraft erzielen. Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses Modell zur Testung von Medikamenten eignet und dem langfristigen Ziel einer personalisierten Therapie einen Schritt näherkommen kann.

8 Summary

Development and validation of an animal model for atopic dermatitis in NOD Scid IL2R γ Chain^{null} mice with humanized immune system

AD as a non-contagious, chronic or chronic recurring skin disease is one of the most frequently occurring chronic diseases in industrial and emerging nations. The main symptoms are pruritus and eczema; many children are particularly affected. The pathogenesis of the disease remains not completely understood until now.

The mouse line NOD Scid IL2R γ Chain^{null} used in this research can partially reflect one patient's immune system through reconstitution with human PBMC. In this experiment, it was attempted to create a model for AD in these mice through reconstitution with PBMC from patients with AD and subsequent sensitization with DMSO. Effects on the clinical score, macroscopic skin score, histological score, different human leukocyte populations, as well as inflammatory cytokines and human interleukins were evaluated.

The results show that a reconstitution with PBMC from a patient with AD and an additional sensitization are necessary to generate AD similar symptoms. With the experiment protocol used in this analysis, it was possible to create a stable, reproducible model for AD with NOD Scid IL2R γ Chain^{null} mice, which is characterized by an increase in activated monocytes and T cells as well as an increase in the measured cytokines MCP-3, TSLP, IL-4, IL-12p70 and IL-17A.

To validate the model, a therapy with 1 mg/kg prednisolone was tested and the impacts on the above-mentioned parameters were examined. A therapy with prednisolone led to a reduction of the clinical and histological score and changes in the measured cell populations as well as the cytokines. An oPLS-DA of the experimental data revealed that a treatment with 1 mg/kg prednisolone achieved a high effect in the animal model.

Additionally, immunological profiling of patients with AD was performed, which showed that it was possible to create a reproducible mouse model, despite the huge variability of donors.

By combining immunological profiling with this animal model, preclinical studies could gain a higher validity. Thus, it could be shown that this is a representative model for the testing of pharmaceuticals and can lead to a personalized therapy in the long run.

9 Literaturverzeichnis

- Abos, B., Wang, T., Secombes, C. J. & Tafalla, C. (2020). Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM(+) B cells. *Developmental and Comparative Immunology*, *111*, 103752. doi:10.1016/j.dci.2020.103752
- Abraham, S. N. & Arock, M. (1998). *Mast cells and basophils in innate immunity*. Paper presented at the Seminars in Immunology.
- Abusleme, L. & Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Diseases*, *23*(7), 854-865. doi:10.1111/odi.12598
- Ahn, K., Kim, B. E., Kim, J. & Leung, D. Y. M. (2020). Recent advances in atopic dermatitis. *Current Opinion in Immunology*, *66*, 14-21.
- Aioi, A., Tonogaito, H., Suto, H., Hamada, K., Ra, C. R., Ogawa, H., . . . Matsuda, H. (2001). Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, *144*(1), 12-18. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.03946.x
- Akdis, C. A., Akdis, M., Bieber, T., Bindslev-Jensen, C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P. A., . . . Lipozencic, J. (2006). Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(1), 152-169.
- Ali, N., Flutter, B., Rodriguez, R. S., Sharif-Paghaleh, E., Barber, L. D., Lombardi, G. & Nestle, F. O. (2012). Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R γ null mice display a T-effector memory phenotype. *PloS One*, *7*(8), e44219.
- Allen, T. M., Brehm, M. A., Bridges, S., Ferguson, S., Kumar, P., Mirochnitchenko, O., . . . Shultz, L. D. (2019). Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities. *Nature Immunology*, *20*(7), 770-774.
- Altrichter, S., Kriehuber, E., Moser, J., Valenta, R., Kopp, T. & Stingl, G. (2008). Serum IgE autoantibodies target keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *128*(9), 2232-2239. doi:10.1038/jid.2008.80
- Arad, G., Levy, R., Nasie, I., Hillman, D., Rotfogel, Z., Barash, U., . . . Kaempfer, R. (2011). Binding of superantigen toxins into the CD28 homodimer interface is essential for induction of cytokine genes that mediate lethal shock. *PLoS Biology*, *9*(9), e1001149. doi:10.1371/journal.pbio.1001149
- Aranez, V. & Ambrus, J., Jr. (2020). Immunologic Adverse Effects of Biologics for the Treatment of Atopy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *59*(2), 220-230. doi:10.1007/s12016-019-08739-8
- Arzumanyan, V. G., Serdyuk, O. A., Kozlova, N. N., Basnak'yan, I. A. & Fedoseeva, V. N. (2003). IgE and IgG antibodies to *Malassezia* spp. yeast extract in patients with atopic dermatitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *135*(5), 460-463. doi:10.1023/a:1024967426025
- Asher, M. I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K. & Williams, H. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, *368*(9537), 733-743. doi:10.1016/s0140-6736(06)69283-0
- Auriemma, M., Vianale, G., Amerio, P. & Reale, M. (2013). Cytokines and T cells in atopic dermatitis. *European Cytokine Network*, *24*(1), 37-44. doi:10.1684/ecn.2013.0333
- Bansal-Pakala, P., Jember, A. G.-H. & Croft, M. (2001). Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance. *Nature Medicine*, *7*(8), 907-912.

- Barnetson, R. S., Wright, A. L. & Benton, E. C. (1989). IgE-mediated allergy in adults with severe atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy*, 19(3), 321-325. doi:10.1111/j.1365-2222.1989.tb02390.x
- Barton, D., HogenEsch, H. & Weih, F. (2000). Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis. *European Journal of Immunology*, 30(8), 2323-2332. doi:10.1002/1521-4141(2000)30:8<2323::Aid-immu2323>3.0.Co;2-h
- Beltrani, V. S. & Boguniewicz, M. (2003). Atopic dermatitis. *Dermatology Online Journal*, 9(2), 1.
- Berke, R., Singh, A. & Guralnick, M. (2012). Atopic dermatitis: an overview. *American Family Physician*, 86(1), 35-42.
- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*, 358(14), 1483-1494. doi:10.1056/NEJMra074081
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17, 189-220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189
- Bobrow, M., Adler, K. & Schermer, M. (2006). WO Patent No. WO 2007/075891 A2. W. I. P. Organization.
- Boguniewicz, M. & Leung, D. Y. (2011). Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological Reviews*, 242(1), 233-246. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01027.x
- Boguniewicz, M., Schmid-Grendelmeier, P. & Leung, D. Y. (2006). Atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(1), 40-43. doi:10.1016/j.jaci.2006.04.044
- Brandt, E. B. & Sivaprasad, U. (2011). Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 2(3). doi:10.4172/2155-9899.1000110
- Brauweiler, A. M., Bin, L., Kim, B. E., Oyoshi, M. K., Geha, R. S., Goleva, E. & Leung, D. Y. (2013). Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal α -toxin-induced keratinocyte death. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2), 421-427.e421-422. doi:10.1016/j.jaci.2012.10.030
- Brauweiler, A. M., Goleva, E. & Leung, D. Y. M. (2014). Th2 cytokines increase Staphylococcus aureus alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *Journal of Investigative Dermatology*, 134(8), 2114-2121. doi:10.1038/jid.2014.43
- Brehm, M. A., Bortell, R., Verma, M., Shultz, L. D. & Greiner, D. L. (2016). Humanized mice in translational immunology. *Translational Immunology: Mechanisms and Pharmacological Approaches*, 285-326.
- Breuer, K., Wittmann, M., Kempe, K., Kapp, A., Mai, U., Dittrich-Breiholz, O., . . . Werfel, T. (2005). Alpha-toxin is produced by skin colonizing Staphylococcus aureus and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 35(8), 1088-1095. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02295.x
- Brunner, P. M., Suárez-Fariñas, M., He, H., Malik, K., Wen, H. C., Gonzalez, J., . . . Guttman-Yassky, E. (2017). The atopic dermatitis blood signature is characterized by increases in inflammatory and cardiovascular risk proteins. *Scientific Reports*, 7(1), 8707. doi:10.1038/s41598-017-09207-z
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E. & Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 20(8-10), 341-351.

- Calderhead, D. M., Buhlmann, J. E., van den Eertwegh, A. J., Claassen, E., Noelle, R. J. & Fell, H. P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. *Journal of Immunology*, *151*(10), 5261-5271.
- Callewaert, C., Nakatsuji, T., Knight, R., Kosciulek, T., Vrbanc, A., Kotol, P., . . . Bissonnette, R. (2020). IL-4R α blockade by dupilumab decreases *Staphylococcus aureus* colonization and increases microbial diversity in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *140*(1), 191-202. e197.
- Cesare, A. D., Meglio, P. D. & Nestle, F. O. (2008). A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? *Journal of Investigative Dermatology*, *128*(11), 2569-2571. doi:10.1038/jid.2008.283
- Chan, L. S., Robinson, N. & 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. *Journal of Investigative Dermatology*, *117*(4), 977-983.
- Chandler, D. & Herren, M. (2001). WO Patent No. WO 01/78087 A2. W. I. P. Organization.
- Cheuk, S., Wikén, M., Blomqvist, L., Nylén, S., Talme, T., Ståhle, M. & Eidsmo, L. (2014). Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *Journal of Immunology*, *192*(7), 3111-3120. doi:10.4049/jimmunol.1302313
- Cloarec, O., Dumas, M.-E., Craig, A., Barton, R. H., Trygg, J., Hudson, J., . . . Holmes, E. (2005). Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic 1H NMR data sets. *Analytical Chemistry*, *77*(5), 1282-1289.
- Coleman, R., Trembath, R. C. & Harper, J. I. (1997). Genetic studies of atopy and atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, *136*(1), 1-5.
- Cork, M. J., Eckert, L., Simpson, E. L., Armstrong, A., Barbarot, S., Puig, L., . . . Chao, J. (2020). Dupilumab improves patient-reported symptoms of atopic dermatitis, symptoms of anxiety and depression, and health-related quality of life in moderate-to-severe atopic dermatitis: analysis of pooled data from the randomized trials SOLO 1 and SOLO 2. *J Dermatolog Treat*, *31*(6), 606-614. doi:10.1080/09546634.2019.1612836
- Cork, M. J., Robinson, D. A., Vasilopoulos, Y., Ferguson, A., Moustafa, M., MacGowan, A., . . . Tazi-Ahnini, R. (2006). New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(1), 3-21; quiz 22-23. doi:10.1016/j.jaci.2006.04.042
- Crack, L. R., Chan, H. W., McPherson, T. & Ogg, G. S. (2011). Phenotypic analysis of perennial airborne allergen-specific CD4⁺ T cells in atopic and non-atopic individuals. *Clinical and Experimental Allergy*, *41*(11), 1555-1567.
- Croft, M., So, T., Duan, W. & Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological Reviews*, *229*(1), 173-191. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x
- Cumming, G. (2014). The new statistics: Why and how. *Psychological Science*, *25*(1), 7-29.
- Dahinden, C. A., Geiser, T., Brunner, T., von Tscherner, V., Caput, D., Ferrara, P., . . . Baggiolini, M. (1994). Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(2), 751-756. doi:10.1084/jem.179.2.751
- de Vries, J. E., Punnonen, J., Cocks, B. G. & Aversa, G. (1993). *The role of T/B cell interactions and cytokines in the regulation of human IgE synthesis*. Paper presented at the Seminars in Immunology.

- Delavary, M. B., van der Veer, W. M., van Egmond, M., Niessen, F. B. & Beelen, R. H. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216(7), 753-762. doi:10.1016/j.imbio.2011.01.001
- Delves, P. J. & Roitt, I. M. (2000). The immune system. *New England Journal of Medicine*, 343(1), 37-49.
- Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Billsborough, J., Presnell, S. R., Haugen, H. S., . . . Bort, S. (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature Immunology*, 5(7), 752-760.
- Drucker, A. M., Wang, A. R., Li, W. Q., Severson, E., Block, J. K. & Qureshi, A. A. (2017). The Burden of Atopic Dermatitis: Summary of a Report for the National Eczema Association. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(1), 26-30. doi:10.1016/j.jid.2016.07.012
- Ehrlich, P. (1907). Chemotherapeutische trypanosomen-studien. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 11, 233-238.
- Ehrlich, P. & Shiga, K. (1904). Farbtherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Berliner klin. Wochenschrift*(13).
- Eichenfield, L. F., Hanifin, J. M., Luger, T. A., Stevens, S. R. & Pride, H. B. (2003). Consensus conference on pediatric atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(6), 1088-1095. doi:10.1016/s0190-9622(03)02539-8
- Eichenfield, L. F., Tom, W. L., Chamlin, S. L., Feldman, S. R., Hanifin, J. M., Simpson, E. L., . . . Sidbury, R. (2014). Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(2), 338-351. doi:10.1016/j.jaad.2013.10.010
- Elias, P. M., Hatano, Y. & Williams, M. L. (2008). Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1337-1343. doi:10.1016/j.jaci.2008.01.022
- Elias, P. M. & Steinhoff, M. (2008). "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(5), 1067-1070. doi:10.1038/jid.2008.88
- European Task Force on Atopic Dermatitis. (1993). Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*, 186(1), 23-31. doi:10.1159/000247298
- Ferreira, M. A., Vonk, J. M., Baurecht, H., Marenholz, I., Tian, C., Hoffman, J. D., . . . Paternoster, L. (2017). Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology. *Nature Genetics*, 49(12), 1752-1757. doi:10.1038/ng.3985
- Fletcher, J. M., Moran, B., Petrasca, A. & Smith, C. M. (2020). IL-17 in inflammatory skin diseases psoriasis and hidradenitis suppurativa. *Clinical and Experimental Immunology*, 201(2), 121-134. doi:10.1111/cei.13449
- Fraser, I. P., Koziel, H. & Ezekowitz, R. A. B. (1998). *The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity*. Paper presented at the Seminars in Immunology.
- Fulton, R. J., McDade, R. L., Smith, P. L., Kienker, L. J. & Kettman Jr, J. R. (1997). Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system. *Clinical Chemistry*, 43(9), 1749-1756.
- Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N. F., Ma, W. & Kumar, A. (2009). The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8(1), 40-52. doi:10.2174/187152809787582507
- Geoghegan, J. A., Irvine, A. D. & Foster, T. J. (2018). Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends in Microbiology*, 26(6), 484-497. doi:10.1016/j.tim.2017.11.008

- Golland, P., Liang, F., Mukherjee, S. & Panchenko, D. (2005). *Permutation tests for classification*. Paper presented at the International Conference on Computational Learning Theory.
- Guttman-Yassky, E., Lowes, M. A., Fuentes-Duculan, J., Zaba, L. C., Cardinale, I., Nograles, K. E., . . . Krueger, J. G. (2008). Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *Journal of Immunology*, *181*(10), 7420-7427. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7420
- Hanifin, J. M. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, *92*, 44-47.
- Hansson, L., Backman, A., Ny, A., Edlund, M., Ekholm, E., Ekstrand Hammarstrom, B., . . . Egelrud, T. (2002). Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *118*(3), 444-449. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01684.x
- Harb, H. & Chatila, T. A. (2020). Mechanisms of Dupilumab. *Clinical and Experimental Allergy*, *50*(1), 5-14. doi:10.1111/cea.13491
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, *6*(11), 1123-1132. doi:10.1038/ni1254
- Hayashida, S., Uchi, H., Moroi, Y. & Furue, M. (2011). Decrease in circulating Th17 cells correlates with increased levels of CCL17, IgE and eosinophils in atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, *61*(3), 180-186. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.10.013
- Heratizadeh, A., Wichmann, K. & Werfel, T. (2011). Food allergy and atopic dermatitis: how are they connected? *Current Allergy and Asthma Reports*, *11*(4), 284-291. doi:10.1007/s11882-011-0202-y
- Herz, U., Schnoy, N., Borelli, S., Weigl, L., Käsbohrer, U., Daser, A., . . . Renz, H. (1998). A human-SCID mouse model for allergic immune response bacterial superantigen enhances skin inflammation and suppresses IgE production. *Journal of Investigative Dermatology*, *110*(3), 224-231. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00119.x
- Hesselton, R. M., Koup, R. A., Cromwell, M. A., Graham, B. S., Johns, M. & Sullivan, J. L. (1993). Human peripheral blood xenografts in the SCID mouse: characterization of immunologic reconstitution. *Journal of Infectious Diseases*, *168*(3), 630-640.
- Ho, J., Tumkaya, T., Aryal, S., Choi, H. & Claridge-Chang, A. (2019). Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. *Nature methods*, *16*(7), 565-566.
- Huang, C. H., Kuo, I. C., Xu, H., Lee, Y. S. & Chua, K. Y. (2003). Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, *121*(2), 289-293. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12356.x
- Igawa, K. (2019). Future trends in the treatment of atopic dermatitis. *Immunol Med*, *42*(1), 10-15. doi:10.1080/25785826.2019.1628467
- Irvine, A. D., McLean, W. H. & Leung, D. Y. (2011). Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, *365*(14), 1315-1327. doi:10.1056/NEJMra1011040
- Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., . . . Hatamochi, A. (2010). Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(10), 2511-2514. doi:10.1038/jid.2010.161
- Ito, Y., Satoh, T., Takayama, K., Miyagishi, C., Walls, A. F. & Yokozeki, H. (2011). Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. *Allergy*, *66*(8), 1107-1113. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02570.x
- Janyst, M., Kaleta, B., Janyst, K., Zagożdżon, R., Kozłowska, E. & Lasek, W. (2020). Comparative Study of Immunomodulatory Agents to Induce Human T Regulatory

- (Treg) Cells: Preferential Treg-Stimulatory Effect of Prednisolone and Rapamycin. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 68(4), 20. doi:10.1007/s00005-020-00582-6
- Jariwala, S. P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J. & Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(11), 1515-1520. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03797.x
- Jarrett, R., Salio, M., Lloyd-Lavery, A., Subramaniam, S., Bourgeois, E., Archer, C., . . . Ogg, G. (2016). Filaggrin inhibits generation of CD1a neolipid antigens by house dust mite-derived phospholipase. *Science Translational Medicine*, 8(325), 325ra318. doi:10.1126/scitranslmed.aad6833
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Thomas, G. D., Hewitson, J. P., Duncan, S., Brombacher, F., . . . Allen, J. E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *Journal of Experimental Medicine*, 210(11), 2477-2491. doi:10.1084/jem.20121999
- Jin, H., He, R., Oyoshi, M. & Geha, R. S. (2009). Animal models of atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(1), 31-40. doi:10.1038/jid.2008.106
- Jodeleit, H., Caesar, J., Villarroel Aguilera, C., Sterz, S., Holdt, L., Beigel, F., . . . Gropp, R. (2019). The Combination of Patient Profiling and Preclinical Studies in a Mouse Model Based on NOD/Scid IL2Rgamma null Mice Reconstituted With Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Ulcerative Colitis May Lead to Stratification of Patients for Treatment With Adalimumab. *Inflammatory Bowel Diseases*. doi:10.1093/ibd/izz284
- Jodeleit, H., Milchram, L., Soldo, R., Beikircher, G., Schönthaler, S., Al-Amodi, O., . . . Gropp, R. (2020a). Autoantibodies as diagnostic markers and potential drivers of inflammation in ulcerative colitis. *PloS One*, 15(2), e0228615. doi:10.1371/journal.pone.0228615
- Jodeleit, H., Winkelmann, P., Caesar, J., Sterz, S., Holdt, L. M., Beigel, F., . . . Gropp, R. (2020b). Head to head study of oxelumab and adalimumab in a mouse model of ulcerative colitis based on NOD/Scid IL-2R γ (null) mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells. *Disease Models & Mechanisms*. doi:10.1242/dmm.046995
- Jungersted, J. M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J. K., . . . Weidinger, S. (2010). Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*, 65(7), 911-918. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x
- Kagawa, Y., Izawa, K., Yano, H. & Kamei, C. (2010). Synergetic effects of prednisolone and olopatadine on atopic dermatitis model of hairless mice. *Pharmacology*, 85(5), 286-294.
- Kamijo, H., Miyagaki, T., Hayashi, Y., Akatsuka, T., Watanabe-Otobe, S., Oka, T., . . . Sato, S. (2020). Increased IL-26 expression promotes T helper type 17- and T helper type 2-associated cytokine production by keratinocytes in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(3), 636-644. e632.
- Kaminuma, O., Nishimura, T., Kitamura, N., Saeki, M., Hiroi, T. & Mori, A. (2018). T-Helper Type 2 Cells Direct Antigen-Induced Eosinophilic Skin Inflammation in Mice. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 10(1), 77-82. doi:10.4168/aaair.2018.10.1.77
- Kasraie, S. & Werfel, T. (2013). Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Mediators of Inflammation*, 2013, 942375. doi:10.1155/2013/942375
- Katsarou, A. & Armenaka, M. (2011). Atopic dermatitis in older patients: particular points. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(1), 12-18. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03737.x

- Katsuta, M., Takigawa, Y., Kimishima, M., Inaoka, M., Takahashi, R. & Shiohara, T. (2006). NK cells and gamma delta+ T cells are phenotypically and functionally defective due to preferential apoptosis in patients with atopic dermatitis. *Journal of Immunology*, 176(12), 7736-7744. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7736
- Kawakami, Y., Yumoto, K. & 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., Gawkrödger, D. J., Mortimer, M. J. & Jaron, A. G. (1994). The prevalence of childhood atopic eczema in a general population. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(1), 35-39. doi:10.1016/s0190-9622(94)70004-4
- Kibbey, C. & Calvet, A. (2005). Molecular Property eXplorer: a novel approach to visualizing SAR using tree-maps and heatmaps. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(2), 523-532.
- Kim, E. H., Kim, S., Lee, J. H., Kim, J., Han, Y., Kim, Y. M., . . . Ahn, K. (2015). Indoor air pollution aggravates symptoms of atopic dermatitis in children. *PloS One*, 10(3), e0119501. doi:10.1371/journal.pone.0119501
- Kim, E. Y., Battaile, J. T., Patel, A. C., You, Y., Agapov, E., Grayson, M. H., . . . Holtzman, M. J. (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nature Medicine*, 14(6), 633-640. doi:10.1038/nm1770
- Kinet, J.-P. (1999). The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 931-972.
- Klicznik, M. M., Morawski, P. A., Höllbacher, B., Varkhande, S. R., Motley, S. J., Kuri-Cervantes, L., . . . Gratz, I. K. (2019). Human CD4(+)CD103(+) cutaneous resident memory T cells are found in the circulation of healthy individuals. *Sci Immunol*, 4(37). doi:10.1126/sciimmunol.aav8995
- Koga, C., Kabashima, K., Shiraishi, N., Kobayashi, M. & Tokura, Y. (2008). Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(11), 2625-2630. doi:10.1038/jid.2008.111
- Kunz, B., Oranje, A. P., Labrèze, L., Stalder, J. F., Ring, J. & Taïeb, A. (1997). Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*, 195(1), 10-19. doi:10.1159/000245677
- Langan, S. M. & Irvine, A. D. (2013). Childhood eczema and the importance of the physical environment. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(7), 1706-1709. doi:10.1038/jid.2013.128
- Laouini, D., Kawamoto, S., Yalcindag, A., Bryce, P., Mizoguchi, E., Oettgen, H. & Geha, R. S. (2003). Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(5), 981-987. doi:10.1016/j.jaci.2003.07.007
- Larsen, F. S., Holm, N. V. & Henningsen, K. (1986). Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15(3), 487-494.
- Lei, W., Zeng, D., Liu, G., Zhu, Y., Wang, J., Wu, H., . . . Huang, J. (2018). Crucial role of OX40/OX40L signaling in a murine model of asthma. *Mol Med Rep*, 17(3), 4213-4220. doi:10.3892/mmr.2018.8453
- Lesiak, A., Smolewski, P., Sobolewska-Sztychny, D., Sysa-Jedrzejowska, A. & Narbutt, J. (2012). The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors 2 and 4 in atopic dermatitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 76(4), 405-410. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02739.x

- Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I. & Hamid, Q. A. (2004a). New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 651-657. doi:10.1172/jci21060
- Leung, D. Y., Harbeck, R., Bina, P., Reiser, R. F., Yang, E., Norris, D. A., . . . Sampson, H. A. (1993). Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *Journal of Clinical Investigation*, 92(3), 1374-1380. doi:10.1172/jci116711
- Leung, D. Y., Nicklas, R. A., Li, J. T., Bernstein, I. L., Blessing-Moore, J., Boguniewicz, M., . . . Tilles, S. A. (2004b). Disease management of atopic dermatitis: an updated practice parameter. Joint Task Force on Practice Parameters. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 93(3 Suppl 2), S1-21. doi:10.1016/s1081-1206(10)61385-3
- Leung, D. Y. & Soter, N. A. (2001). Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44(1 Suppl), S1-S12. doi:10.1067/mjd.2001.109815
- Leyden, J. J., Marples, R. R. & Kligman, A. M. (1974). Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 90(5), 525-530. doi:10.1111/j.1365-2133.1974.tb06447.x
- Li, M., Messaddeq, N., Teletin, M., Pasquali, J. L., Metzger, D. & Chambon, P. (2005). Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14795-14800. doi:10.1073/pnas.0507385102
- Li, X. M., Kleiner, G., Huang, C. K., Lee, S. Y., Schofield, B., Soter, N. A. & Sampson, H. A. (2001). Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(4), 693-702. doi:10.1067/mai.2001.114110
- Lin, Y. T., Wang, C. T., Chao, P. S., Lee, J. H., Wang, L. C., Yu, H. H., . . . Chiang, B. L. (2011). Skin-homing CD4⁺ Foxp3⁺ T cells exert Th2-like function after staphylococcal superantigen stimulation in atopic dermatitis patients. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(4), 516-525. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03681.x
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., . . . Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *Journal of Immunology*, 184(7), 3964-3977. doi:10.4049/jimmunol.0903356
- Ma, X. & Trinchieri, G. (2001). Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Advances in Immunology*, 79, 55-92. doi:10.1016/s0065-2776(01)79002-5
- Man, M. Q., Hatano, Y., Lee, S. H., Man, M., Chang, S., Feingold, K. R., . . . 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. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(1), 79-86. doi:10.1038/sj.jid.5701011
- Margolis, J. S., Abuabara, K., Bilker, W., Hoffstad, O. & Margolis, D. J. (2014). Persistence of mild to moderate atopic dermatitis. *JAMA Dermatol*, 150(6), 593-600. doi:10.1001/jamadermatol.2013.10271
- Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G. P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., . . . Ra, C. (1997). Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *International Immunology*, 9(3), 461-466. doi:10.1093/intimm/9.3.461
- Matsumoto, K., Mizukoshi, K., Oyobikawa, M., Ohshima, H. & 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 Research and Technology*, 10(2), 122-129.
- Mauri, C. & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of Immunology*, 30, 221-241.
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M. & Weissman, I. L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 241(4873), 1632-1639.
- Mirza, R., DiPietro, L. A. & Koh, T. J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *American Journal of Pathology*, 175(6), 2454-2462. doi:10.2353/ajpath.2009.090248
- Mori, T., Ishida, K., Mukumoto, S., Yamada, Y., Imokawa, G., Kabashima, K., . . . Tokura, Y. (2010). Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 162(1), 83-90. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09440.x
- Morren, M. A., Przybilla, B., Bamelis, M., Heykants, B., Reynaers, A. & Degreef, H. (1994). Atopic dermatitis: triggering factors. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(3 Pt 1), 467-473. doi:10.1016/s0190-9622(94)70213-6
- Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. & 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
- Müller, K. (2017). *HeimtierSkills: Praxisleitfaden zu Diagnose und Therapie bei kleinen Heimtieren MemoVet*. Schattauer.
- Nagelkerken, L., Verzaal, P., Lagerweij, T., Persoon-Deen, C., Berbee, J. F., Prens, E. P., . . . Oranje, A. P. (2008). Development of atopic dermatitis in mice transgenic for human apolipoprotein C1. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(5), 1165-1172. doi:10.1038/sj.jid.5701182
- Nakagawa, S., Matsumoto, M., Katayama, Y., Oguma, R., Wakabayashi, S., Nygaard, T., . . . Matsue, H. (2017). Staphylococcus aureus virulent PSM α peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell Host & Microbe*, 22(5), 667-677. e665.
- Nakajima, S., Kabata, H., Kabashima, K. & Asano, K. (2020). Anti-TSLP antibodies: Targeting a master regulator of type 2 immune responses. *Allergology International*, 69(2), 197-203.
- Nguyen, M. T. & Götz, F. (2016). Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria: Key Players in the Immune Response and Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 891-903. doi:10.1128/mmbr.00028-16
- Nograles, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., . . . Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(6), 1244-1252. e1242. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.041
- Nolte, T., Zadeh-Khorasani, M., Safarov, O., Rueff, F., Varga, R., Herbach, N., . . . Siebeck, M. (2013a). Induction of oxazolone-mediated features of atopic dermatitis in NOD-scid IL2R γ (null) mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1), 125-134. doi:10.1242/dmm.009167
- Nolte, T., Zadeh-Khorasani, M., Safarov, O., Rueff, F., Gülberg, V., Herbach, N., . . . Wolf, E. (2013b). Oxazolone and ethanol induce colitis in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 R γ null mice engrafted with human

- peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 172(2), 349-362.
- Novak, N. & Bieber, T. (2005). Pathogenese des atopischen Ekzems: Pathophysiology of atopic eczema. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 3(12), 994-1005.
- Novak, N., Bieber, T. & Leung, D. Y. (2003). Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(6 Suppl), S128-139. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.032
- Nutten, S. (2015). Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66 Suppl 1, 8-16. doi:10.1159/000370220
- Odhiambo, J. A., Williams, H. C., Clayton, T. O., Robertson, C. F., Asher, M. I. & Isaac Phase Three Study Group. (2009). Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(6), 1251-1258 e1223. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.009
- Opal, S. M. & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-1172. doi:10.1378/chest.117.4.1162
- Oranje, A. P., Glazenburg, E. J., Wolkerstorfer, A. & 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. *British Journal of Dermatology*, 157(4), 645-648. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08112.x
- Otsuka, A. & Kabashima, K. (2015). Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy*, 70(2), 131-140. doi:10.1111/all.12526
- Ou, L.-S., Goleva, E., Hall, C. & Leung, D. Y. M. (2004). T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(4), 756-763.
- Pail, P. B., Neculqueo, G. W., Maccari, G. P., Chagastelles, P. C., Freitas, R. D. S., Dagnino, A. P. A. & Campos, M. M. (2019). The role of kinin B(1) and B(2) receptors in the mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis. *International Immunopharmacology*, 72, 62-73. doi:10.1016/j.intimp.2019.03.063
- Palamides, P., Jodeleit, H., Föhlinger, M., Beigel, F., Herbach, N., Mueller, T., . . . Gropp, R. (2016). A mouse model for ulcerative colitis based on NOD-scid IL2R gammanull mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from affected individuals. *Disease Models & Mechanisms*, 9(9), 985-997. doi:10.1242/dmm.025452
- Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., . . . McLean, W. H. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, 38(4), 441-446. doi:10.1038/ng1767
- Pearson, T., Greiner, D. L. & Shultz, L. D. (2008). Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Current Protocols in Immunology*, 81(1), 15.21. 11-15.21. 21.
- Peters, N. & Peters, A. T. (2019). Atopic dermatitis. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(6), 433-436. doi:10.2500/aap.2019.40.4265
- Pschyrembel, W. (2011). *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter.
- Purkerson, J. & Isakson, P. (1992). A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. *The FASEB journal*, 6(14), 3245-3252.
- Ring, J., Alomar, A., Bieber, T., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gelmetti, C., . . . Darsow, U. (2012). Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) Part II. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(9), 1176-1193. doi:10.1111/j.1468-3083.2012.04636.x
- Rodriguez, E., Baurecht, H., Herberich, E., Wagenpfeil, S., Brown, S. J., Cordell, H. J., . . . Weidinger, S. (2009). Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and

- asthma: robust risk factors in atopic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(6), 1361-1370 e1367. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.036
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D. & McLean, W. H. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 9), 1285-1294. doi:10.1242/jcs.033969
- Scalabrin, D. M., Bavbek, S., Perzanowski, M. S., Wilson, B. B., Platts-Mills, T. A. & Wheatley, L. M. (1999). Use of specific IgE in assessing the relevance of fungal and dust mite allergens to atopic dermatitis: a comparison with asthmatic and nonasthmatic control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(6), 1273-1279. doi:10.1016/s0091-6749(99)70024-2
- Schäfer, T., Heinrich, J., Wjst, M., Adam, H., Ring, J. & Wichmann, H. E. (1999). Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(6), 1280-1284. doi:10.1016/s0091-6749(99)70025-4
- Scheerer, C. & Eyerich, K. (2018). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Hautarzt*, 69(3), 191-196. doi:10.1007/s00105-018-4127-4
- Schmid-Grendelmeier, P., Simon, D., Simon, H. U., Akdis, C. A. & Wüthrich, B. (2001). Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy*, 56(9), 841-849. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00144.x
- Schmid-Ott, G., Jaeger, B., Adamek, C., Koch, H., Lamprecht, F., Kapp, A. & Werfel, T. (2001). Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(1), 171-177. doi:10.1067/mai.2001.111850
- Schmitt, J., Abraham, S., Trautmann, F., Stephan, V., Fölster-Holst, R., Homey, B., . . . Augustin, M. (2017). Usage and effectiveness of systemic treatments in adults with severe atopic eczema: first results of the German Atopic Eczema Registry TREATgermany. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 15(1), 49-59.
- Schmitt, J., Schäkel, K., Fölster-Holst, R., Bauer, A., Oertel, R., Augustin, M., . . . Meurer, M. (2010). Prednisolone vs. ciclosporin for severe adult eczema. An investigator-initiated double-blind placebo-controlled multicentre trial. *British Journal of Dermatology*, 162(3), 661-668.
- Schneider, C., Döcke, W.-D. F., Zollner, T. M. & Röse, L. (2009). Chronic mouse model of TMA-induced contact hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(4), 899-907.
- Schuster, M., Tschernig, T., Krug, N. & Pabst, R. (2000). Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the brown Norway rat. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(2), 558-566.
- Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature Reviews: Immunology*, 12(11), 786-798. doi:10.1038/nri3311
- Shultz, L. D., Keck, J., Burzenski, L., Jangalwe, S., Vaidya, S., Greiner, D. L. & Brehm, M. A. (2019). Humanized mouse models of immunological diseases and precision medicine. *Mammalian Genome*, 30(5-6), 123-142.
- Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., . . . Handgretinger, R. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human

- hemopoietic stem cells. *Journal of Immunology*, 174(10), 6477-6489. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6477
- So, T., Lee, S. W. & Croft, M. (2008). Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 19(3-4), 253-262. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.04.003
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., . . . Liu, Y. J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), 673-680. doi:10.1038/ni805
- Souwer, Y., Szegedi, K., Kapsenberg, M. L. & de Jong, E. C. (2010). IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Current Opinion in Immunology*, 22(6), 821-826. doi:10.1016/j.coi.2010.10.013
- Spergel, J. M. (2005). Atopic march: link to upper airways. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5(1), 17-21. doi:10.1097/00130832-200502000-00005
- Spergel, J. M. (2010). From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 105(2), 99-106; quiz 107-109, 117. doi:10.1016/j.anai.2009.10.002
- Spergel, J. M., Mizoguchi, E., Brewer, J. P., Martin, T. R., Bhan, A. K. & Geha, R. S. (1998). Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1614-1622. doi:10.1172/jci1647
- Spergel, J. M. & Paller, A. S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(6 Suppl), S118-127. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.033
- Stary, G., Bangert, C., Stingl, G. & Kopp, T. (2005). Dendritic cells in atopic dermatitis: expression of FcεpsilonRI on two distinct inflammation-associated subsets. *International Archives of Allergy and Immunology*, 138(4), 278-290. doi:10.1159/000088865
- Stöcker, W. & Schlumberger, W. (2019). Luminex-Assay. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1538-1538): Springer.
- Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1), A. 3B. 1-A. 3B. 2.
- Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., . . . Takeshita, T. (1996). The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annual Review of Immunology*, 14, 179-205. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.179
- Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., . . . Takeuchi, T. (2010). Oral administration of paramylon, a β-1, 3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1002090154-1002090154.
- Szegedi, K., Kremer, A. E., Kezic, S., Teunissen, M. B., Bos, J. D., Luiten, R. M., . . . Middelkamp-Hup, M. A. (2012). Increased frequencies of IL-31-producing T cells are found in chronic atopic dermatitis skin. *Experimental Dermatology*, 21(6), 431-436. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01487.x
- Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L. C., Murata, K., Satomi, S., . . . Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *Journal of Immunology*, 172(6), 3580-3589. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3580
- Tan, B. B., Weald, D., Strickland, I. & Friedmann, P. S. (1996). Double-blind controlled trial of effect of housedust-mite allergen avoidance on atopic dermatitis. *Lancet*, 347(8993), 15-18. doi:10.1016/s0140-6736(96)91556-1

- Tanaka, K., Sugiura, H., Uehara, M., Hashimoto, Y., Donnelly, C. & Montgomery, D. S. (2001). Lack of association between atopic eczema and the genetic variants of interleukin-4 and the interleukin-4 receptor α chain gene: heterogeneity of genetic backgrounds on immunoglobulin E production in atopic eczema patients. *Clinical and Experimental Allergy*, 31(10), 1522-1527.
- Tay, A. S. L., Li, C., Nandi, T., Chng, K. R., Andiappan, A. K., Mettu, V. S., . . . Common, J. E. A. (2020). Atopic dermatitis microbiomes stratify into ecological dermatotypes enabling microbial virulence and disease severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. doi:10.1016/j.jaci.2020.09.031
- Tay, Y. K., Chan, Y. C., Chandran, N. S., Ho, M. S. L., Koh, M. J. A., Lim, Y. L., . . . Thirumorthy, T. (2016). Guidelines for the management of atopic dermatitis in Singapore. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 45(10), 439-450.
- Tazawa, T., Sugiura, H., Sugiura, Y. & Uehara, M. (2004). Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Archives of dermatological research*, 295(11), 459-464.
- Theocharides, A. P., Rongvaux, A., Fritsch, K., Flavell, R. A. & Manz, M. G. (2016). Humanized hemato-lymphoid system mice. *Haematologica*, 101(1), 5-19. doi:10.3324/haematol.2014.115212
- Toda, M., Leung, D. Y., Molet, S., Boguniewicz, M., Taha, R., Christodoulopoulos, P., . . . Hamid, Q. A. (2003). Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(4), 875-881. doi:10.1067/mai.2003.1414
- Tokura, Y. (2010). Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 58(1), 1-7. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.02.008
- Totté, J. E., van der Feltz, W. T., Hennekam, M., van Belkum, A., van Zuuren, E. J. & Pasmans, S. G. (2016). Prevalence and odds of Staphylococcus aureus carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*, 175(4), 687-695. doi:10.1111/bjd.14566
- Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., . . . Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular Biosystems*, 11(1), 13-19.
- Trygg, J. & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 16(3), 119-128.
- Tsukuba, T., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yanagawa, M., Kohmura, K., Yasuda, Y., . . . Nakayama, K. I. (2003). Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *Journal of Biochemistry*, 134(6), 893-902. doi:10.1093/jb/mvg216
- Tsukumo, Y., Harada, D. & Manabe, H. (2010). Pharmacological characterization of itch-associated response induced by repeated application of oxazolone in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 113(3), 255-262. doi:10.1254/jphs.10050fp
- Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B. & Baggiolini, M. (1995). Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *European Journal of Immunology*, 25(1), 64-68. doi:10.1002/eji.1830250113
- Umetsu, D. T., Akbari, O. & Dekruyff, R. H. (2003). Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(3), 480-487; quiz 488.
- Valenta, R., Maurer, D., Steiner, R., Seiberler, S., Sperr, W. R., Valent, P., . . . Stingl, G. (1996). Immunoglobulin E response to human proteins in atopic patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(2), 203-208. doi:10.1111/1523-1747.ep12329617

- Valledor, A. F., Comalada, M., Santamaría-Babi, L. F., Lloberas, J. & Celada, A. (2010). Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. *Advances in Immunology*, *108*, 1-20. doi:10.1016/b978-0-12-380995-7.00001-x
- van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J. P. & Opdenakker, G. (1992). Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *Journal of Experimental Medicine*, *176*(1), 59-65. doi:10.1084/jem.176.1.59
- Vercelli, D., Jabara, H. H., Arai, K., Yokota, T. & Geha, R. S. (1989). Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *European Journal of Immunology*, *19*(8), 1419-1424. doi:10.1002/eji.1830190811
- Vignali, D. A. & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, *13*(8), 722-728. doi:10.1038/ni.2366
- Voegeli, R., Rawlings, A. V., Breternitz, M., Doppler, S., Schreier, T. & Fluhr, J. W. (2009). Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *British Journal of Dermatology*, *161*(1), 70-77. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09142.x
- von Bubnoff, D., Andrès, E., Hentges, F., Bieber, T., Michel, T. & Zimmer, J. (2010). Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(1), 60-68. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.020
- Walsh, N. C., Kenney, L. L., Jangalwe, S., Aryee, K. E., Greiner, D. L., Brehm, M. A. & Shultz, L. D. (2017). Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annual Review of Pathology*, *12*, 187-215. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100332
- Wang, Y. H. & Liu, Y. J. (2009). Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clinical and Experimental Allergy*, *39*(6), 798-806. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03241.x
- Watanabe, R., Gehad, A., Yang, C., Scott, L. L., Teague, J. E., Schlapbach, C., . . . Clark, R. A. (2015). Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Science Translational Medicine*, *7*(279), 279ra239. doi:10.1126/scitranslmed.3010302
- Webb, G. J., Hirschfield, G. M. & Lane, P. J. (2016). OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *50*(3), 312-332. doi:10.1007/s12016-015-8498-3
- Weih, F., Warr, G., Yang, H. & Bravo, R. (1997). Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *The Journal of Immunology*, *158*(11), 5211-5218.
- Werfel, T., Aberer, W., Augustin, M., Biedermann, T., Fölster-Holst, R., Friedrichs, F., . . . Worm, M. (2009). Atopic dermatitis: S2 guidelines. *J Dtsch Dermatol Ges*, *7 Suppl 1*, S1-46. doi:10.1111/j.1610-0387.2009.06972.x
- Werfel, T., Heratizadeh, A., Niebuhr, M., Kapp, A., Roesner, L. M., Karch, A., . . . Hohlfeld, J. M. (2015). Exacerbation of atopic dermatitis on grass pollen exposure in an environmental challenge chamber. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(1), 96-103.e109. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.015
- Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J. J., . . . van Dorsten, F. A. (2008). Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, *4*(1), 81-89.
- Wierenga, E. A., Snoek, M., Jansen, H. M., Bos, J. D., Van Lier, R. A. & Kapsenberg, M. L. (1991). Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *The Journal of Immunology*, *147*(9), 2942-2949.
- Williams, H. C. (2005). Clinical practice. Atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*, *352*(22), 2314-2324. doi:10.1056/NEJMc042803

- Williams, M. R. & Gallo, R. L. (2015). The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(11), 65. doi:10.1007/s11882-015-0567-4
- Wolkerstorfer, A., de Waard van der Spek, F. B., Glazenburg, E. J., Mulder, P. G. & Oranje, A. P. (1999). Scoring the severity of atopic dermatitis: three item severity score as a rough system for daily practice and as a pre-screening tool for studies. *Acta Dermatovenereologica*, 79(5), 356-359. doi:10.1080/000155599750010256
- Wollenberg, A., Kraft, S., Opiel, T. & Bieber, T. (2000). Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. *Clinical and Experimental Dermatology*, 25(7), 530-534. doi:10.1046/j.1365-2230.2000.00699.x
- Wu, C.-F. (1940). Double-staining in toto with hematoxylin and eosin. *Science*, 92(2396), 515-516.
- Yamanaka, K., Tanaka, M., Tsutsui, H., Kupper, T. S., Asahi, K., Okamura, H., . . . Mizutani, H. (2000). Skin-specific caspase-1-transgenic mice show cutaneous apoptosis and pre-endotoxin shock condition with a high serum level of IL-18. *Journal of Immunology*, 165(2), 997-1003. doi:10.4049/jimmunol.165.2.997
- Yawalkar, N., Ugucioni, M., Schärer, J., Braunwalder, J., Karlen, S., Dewald, B., . . . Baggiolini, M. (1999). Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 113(1), 43-48. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00619.x
- Yoo, J., Omori, M., Gyarmati, D., Zhou, B., Aye, T., Brewer, A., . . . Ziegler, S. F. (2005). Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *The Journal of experimental medicine*, 202(4), 541-549.
- Yoon, N. Y., young Jung, M., Kim, D. H., Lee, H. J. & Choi, E. H. (2015). Topical glucocorticoid or pimecrolimus treatment suppresses thymic stromal lymphopoietin-related allergic inflammatory mechanism in an oxazolone-induced atopic dermatitis murine model. *Archives of dermatological research*, 307(7), 569-581.
- Yoshimura, A., Ito, M., Chikuma, S., Akanuma, T. & Nakatsukasa, H. (2018). Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7). doi:10.1101/cshperspect.a028571
- Zadeh-Khorasani, M., Nolte, T., Mueller, T. D., Pechlivanis, M., Rueff, F., Wollenberg, A., . . . Gropp, R. (2013). NOD-scid IL2R γ null mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells as a model to test therapeutics targeting human signaling pathways. *Journal of Translational Medicine*, 11, 4-4. doi:10.1186/1479-5876-11-4
- Zheng, T., Yu, J., Oh, M. H. & Zhu, Z. (2011). The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 3(2), 67-73. doi:10.4168/aair.2011.3.2.67
- Zschaler, J., Schlorke, D. & Arnhold, J. (2014). Differences in innate immune response between man and mouse. *Critical Reviews in Immunology*, 34(5), 433-454.

10 Anhang

10.1 FACS Gatingstrategie

10.1.1 FACS Gatingstrategie PBMC

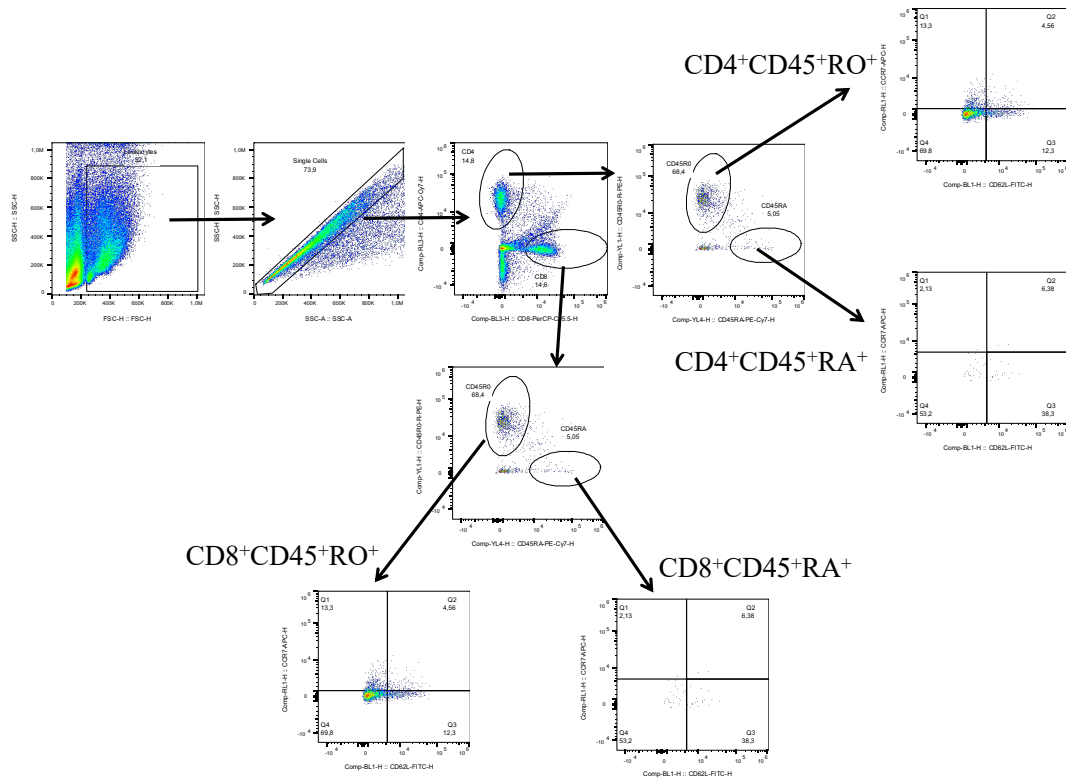


Abbildung 31: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in den PBMC, Teil 1

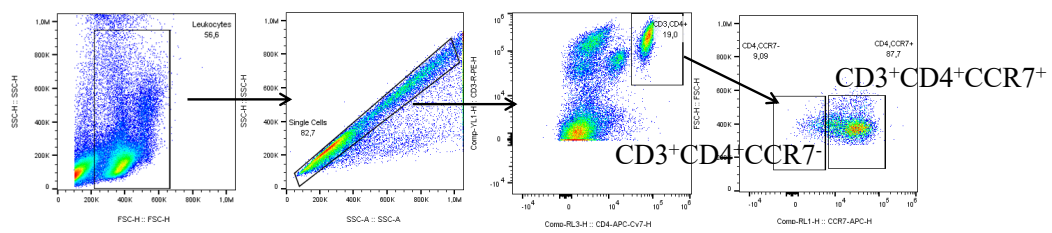


Abbildung 32: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in den PBMC, Teil 2

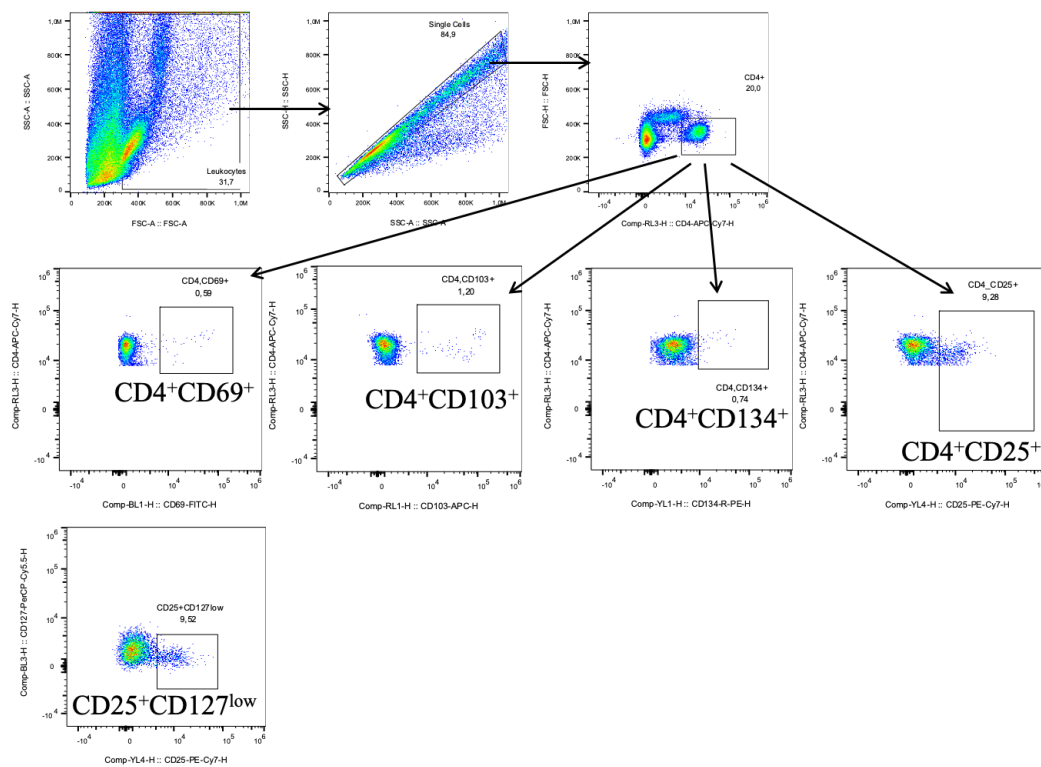


Abbildung 33: Gating zur Differenzierung der T-Zellaktivierung in den PBMC

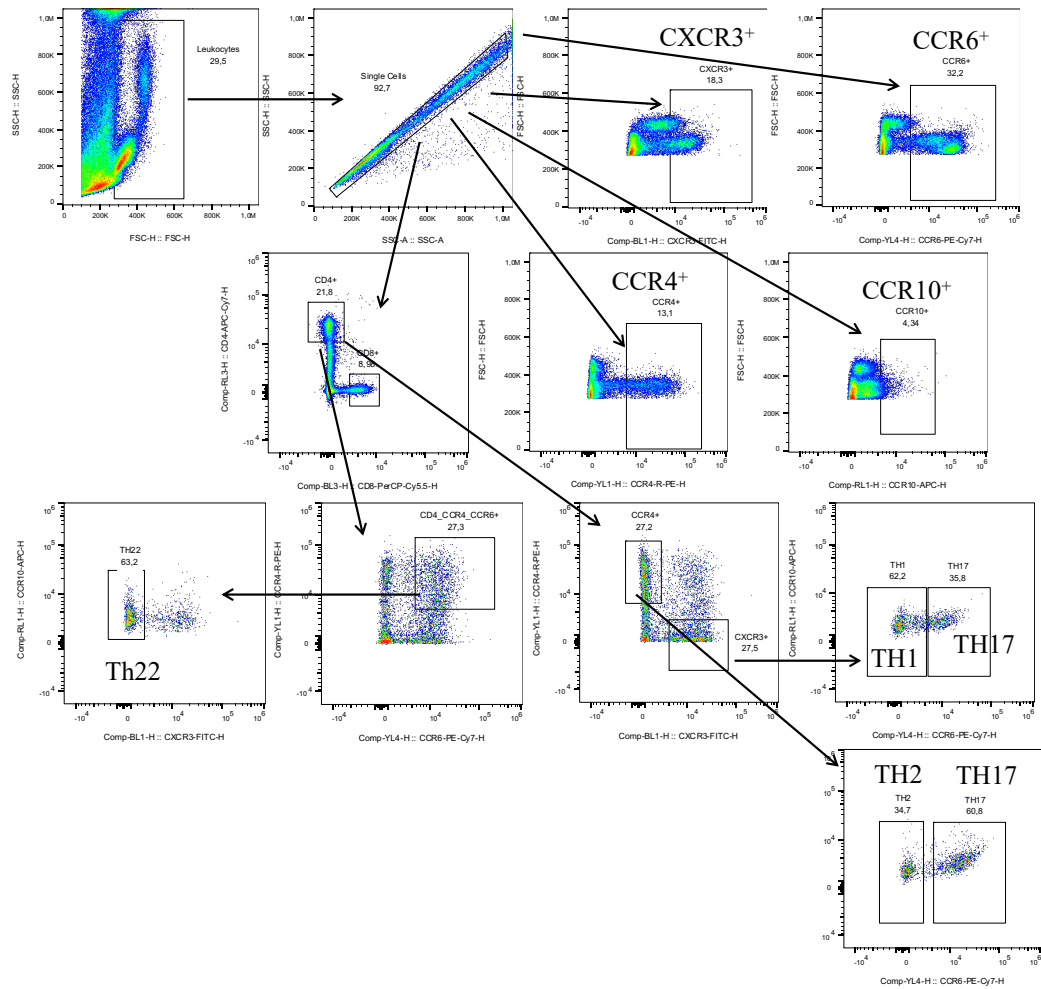


Abbildung 34: Gating zur Differenzierung der T-Helferzellen in den PBMC

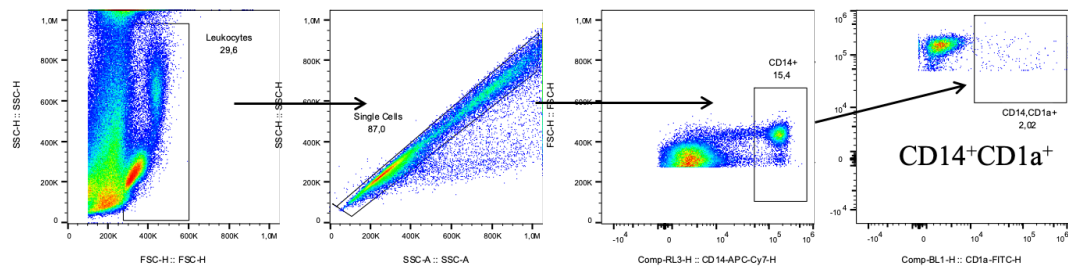


Abbildung 35: Gating zur Differenzierung der Monozyten in den PBMC, Teil 1

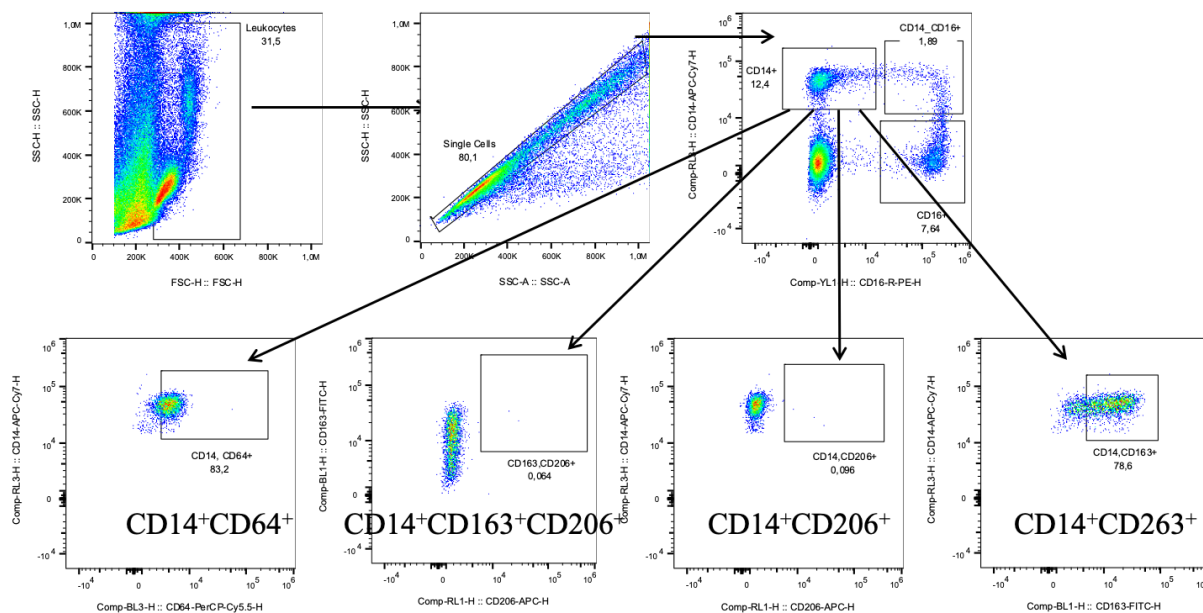


Abbildung 36: Gating zur Differenzierung der Monozyten in den PBMC, Teil 2

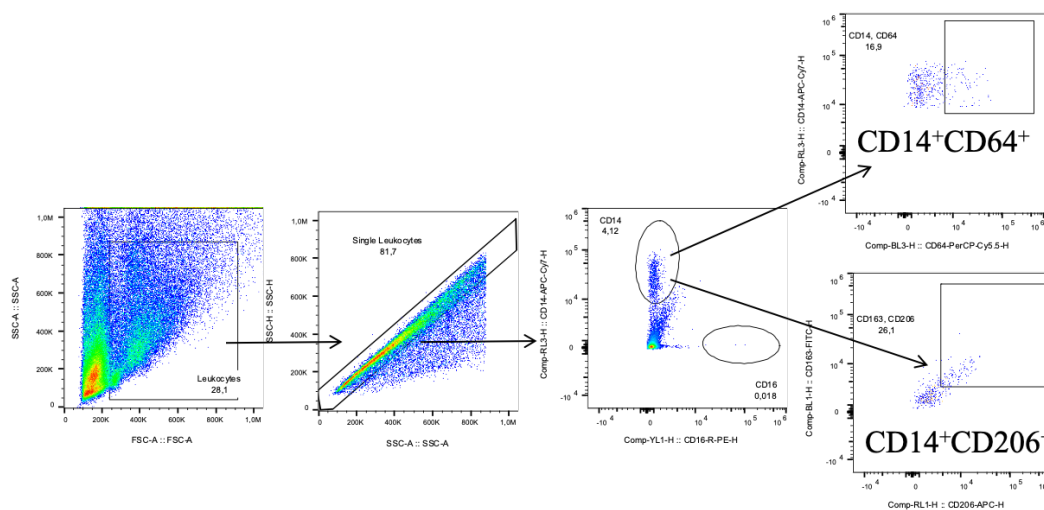


Abbildung 37: Gating zur Differenzierung der Monozyten in den PBMC, Teil 3

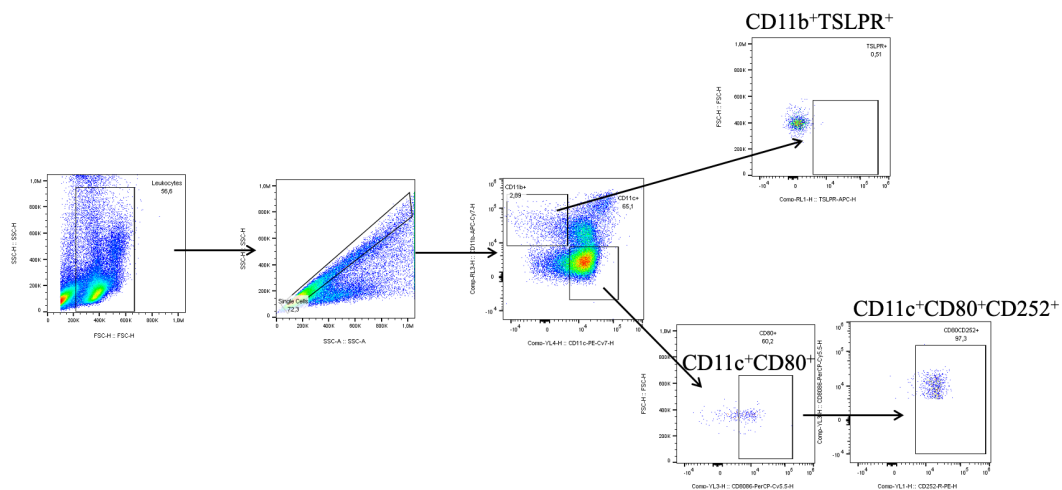


Abbildung 38: Gating zur Differenzierung der dendritischen Zellen in den PBMC

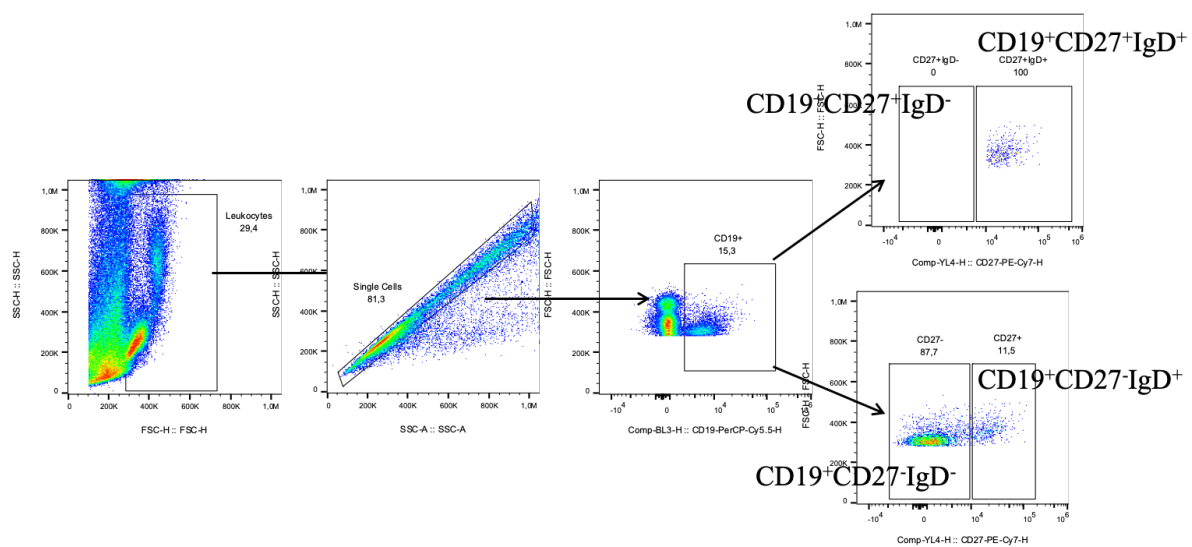


Abbildung 39: Gating zur Differenzierung der B-Zellen in den PBMC

10.1.2 FACS Gatingstrategie Milz

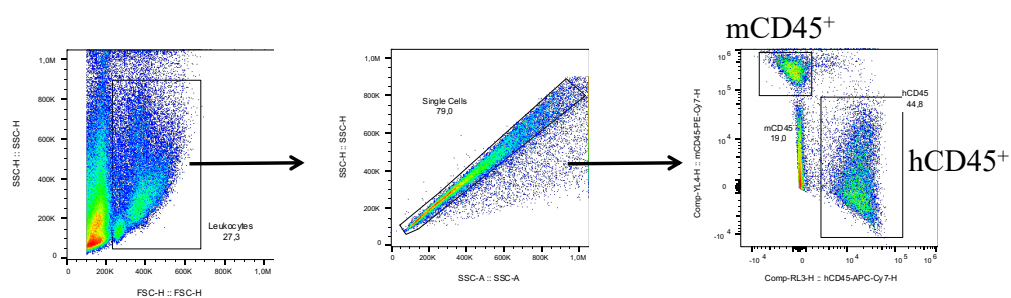


Abbildung 40: Gating zur Differenzierung von hCD45 und mCD45 in der Milz

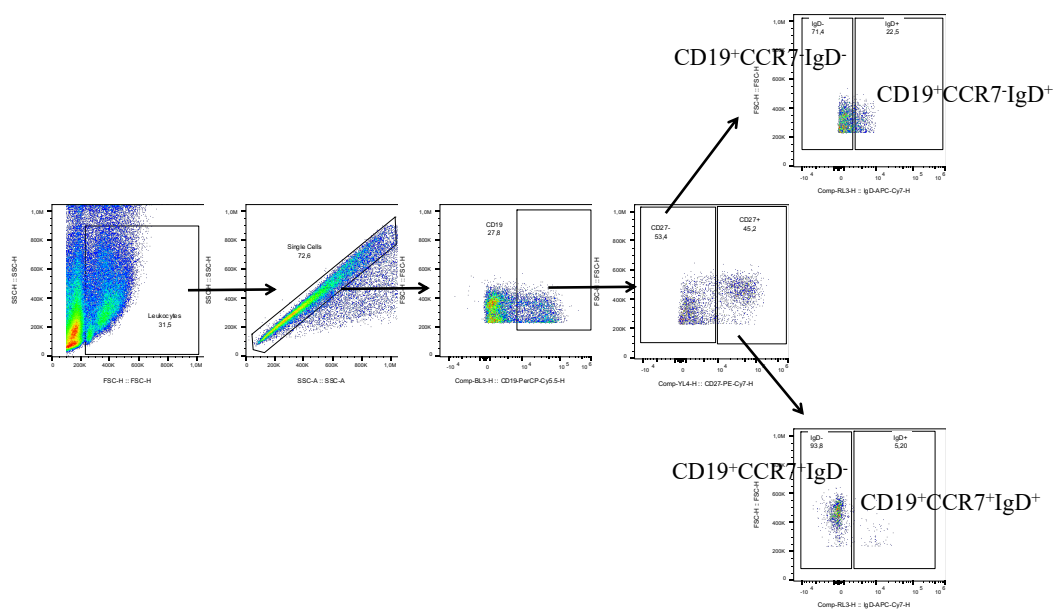


Abbildung 41: Gating zur Differenzierung der B-Zellen in der Milz

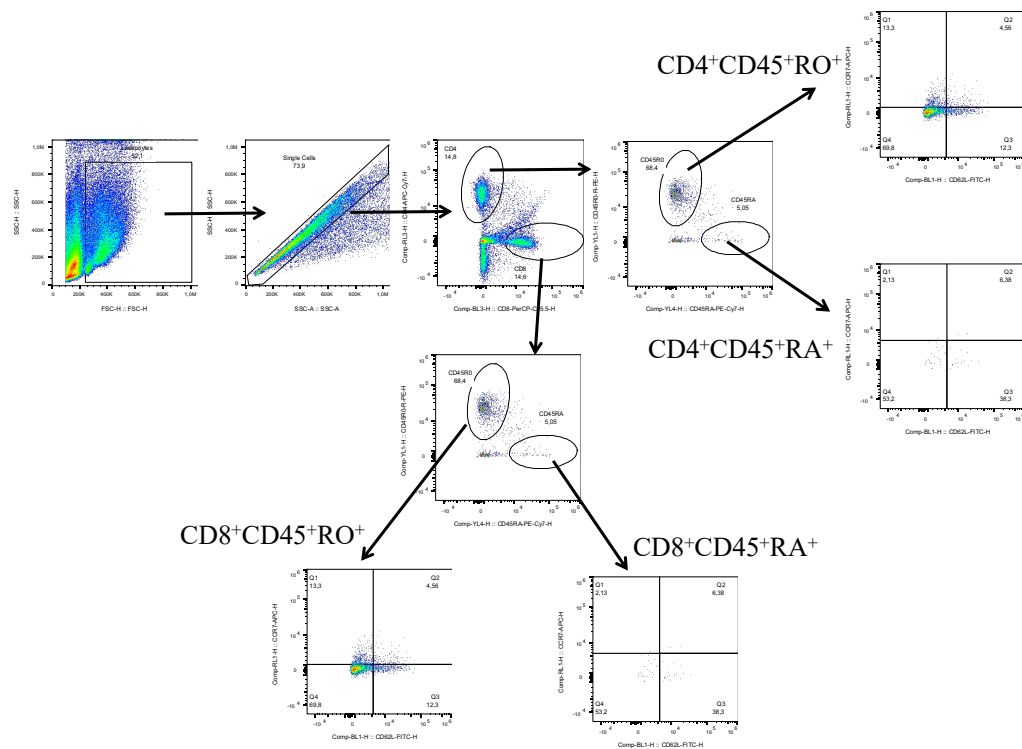


Abbildung 42: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in der Milz, Teil 1

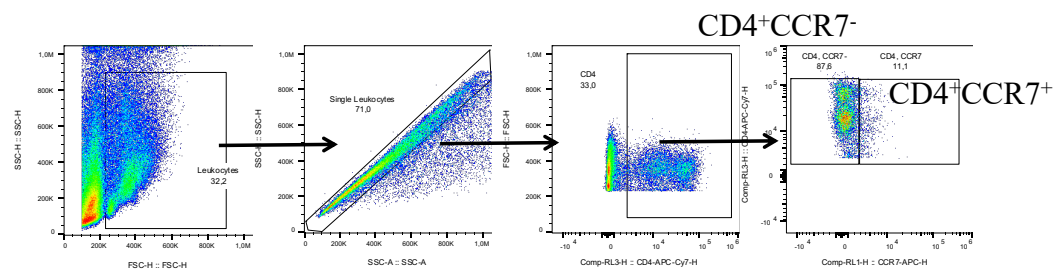


Abbildung 43: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in der Milz, Teil 2

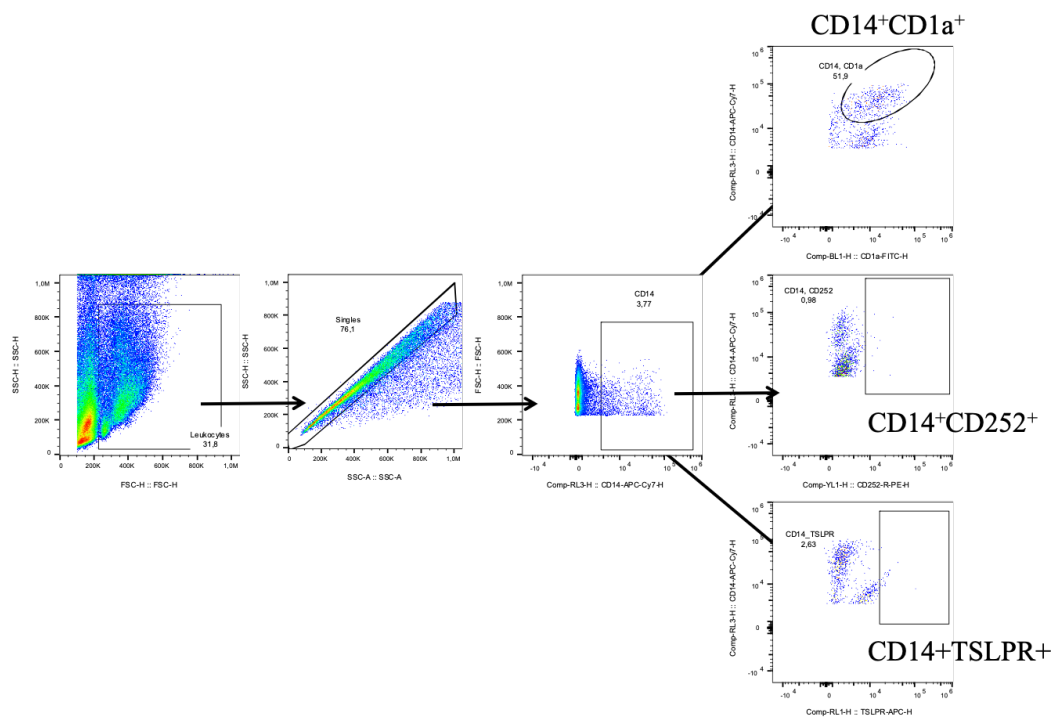


Abbildung 44: Gating zur Differenzierung der Monozyten in der Milz, Teil 1

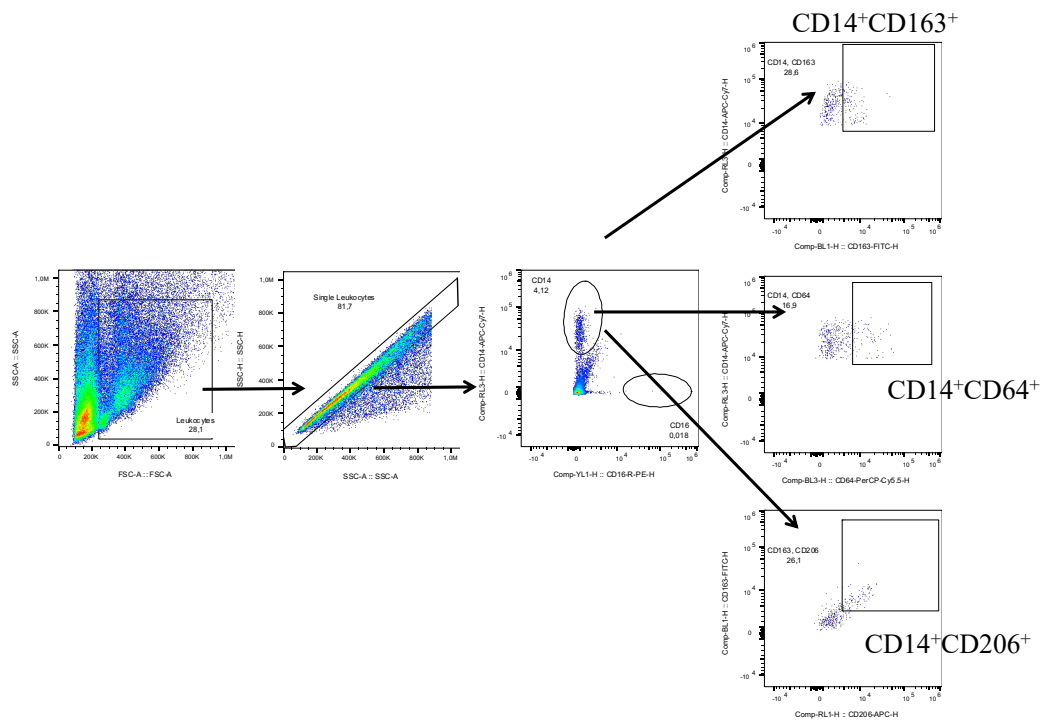


Abbildung 45: Gating zur Differenzierung der Monozyten in der Milz, Teil 2

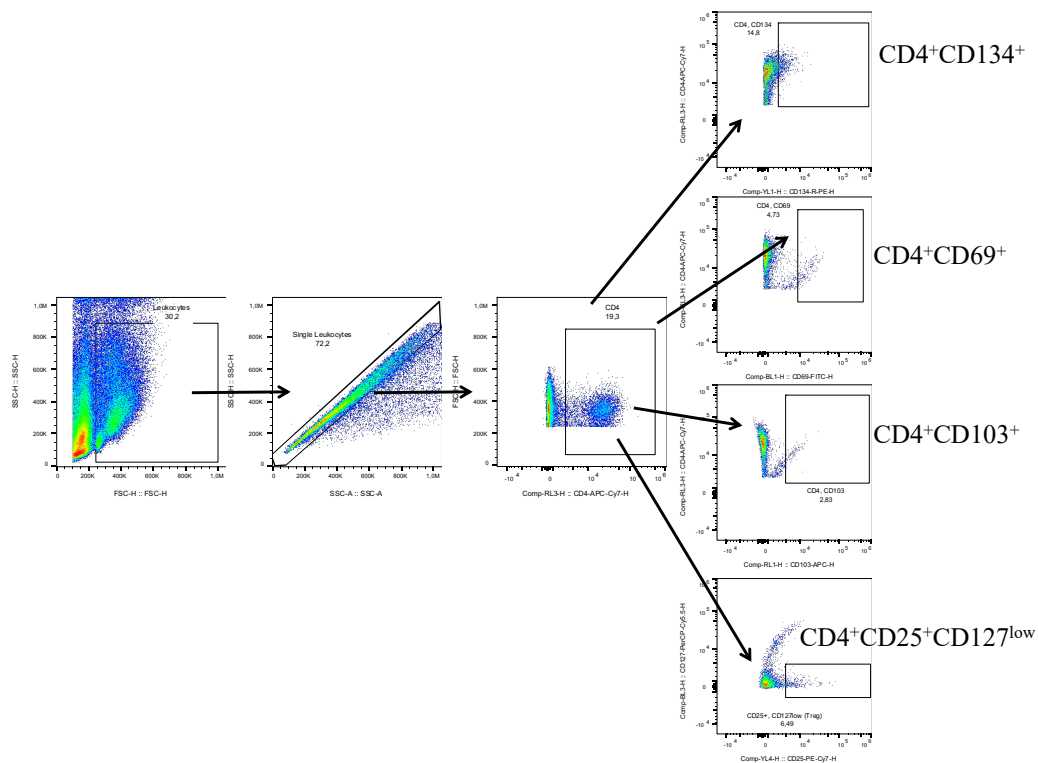


Abbildung 46: Gating zur Differenzierung der T-Zell-Aktivierung in der Milz

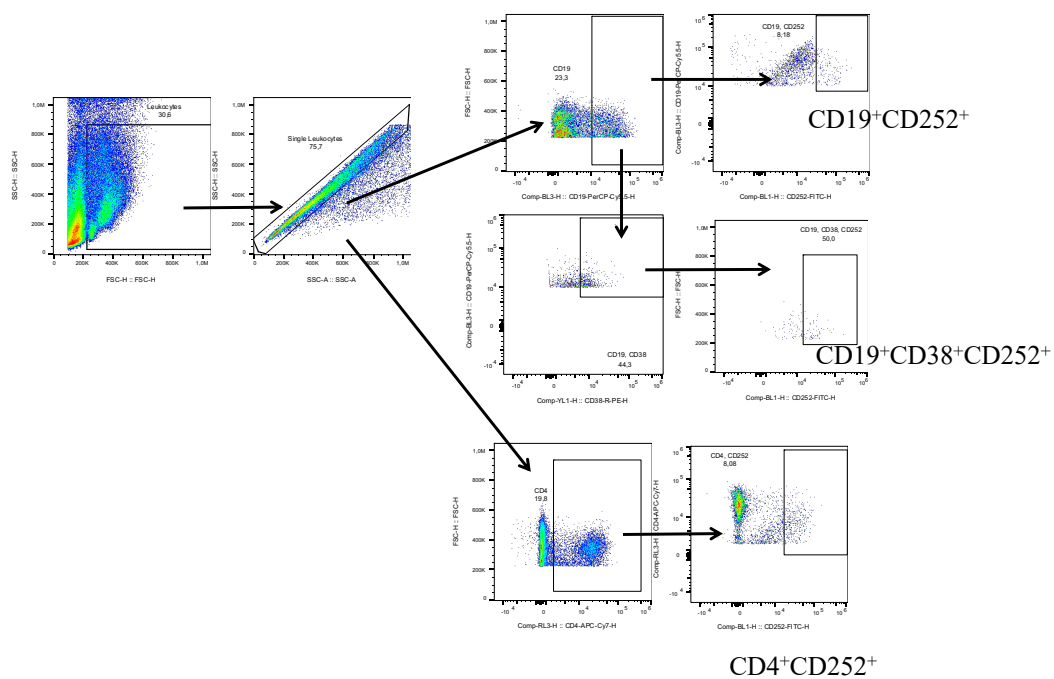


Abbildung 47: Gating zur Differenzierung von T-Zellen bzw. B-Zellen und CD252 in der Milz

10.2 FACS Antikörper

Tabelle 11: Liste der verwendeten FACS Antikörper

Oberflächenmarker	Farbe	Katalognummer
Anti-mouse CD45	PE/Cy7	103113
CCR10	APC	341505
CD103 (Integrin aE)	APC	350215
CD11b	APC/Cy7	301341
CD11c	PE/Cy7	301607
CD127 (IL-7Ra)	PerCP/Cy5.5	351321
CD134 (OX40)	PE	350003
CD14	APC/Cy7	325619
CD163	FITC	333617
CD183 (CXCR3)	FITC	353703
CD19	PerCP/Cy5.5	302230
CD194 (CCR4)	PE	359411
CD196 (CCR6)	PE/Cy7	353417
CD197 (CCR7)	APC	353213
CD1a	Biotin	300112
CD206 (MMR)	APC	321109
CD25	PE/Cy7	302611
CD252 (OX40L)	PE	326307
CD27	PE/Cy7	356411
CD38	PE	356603
CD4	APCCy7	317417

Oberflächenmarker	Farbe	Katalognummer
CD45	APC/Cy7	368515
CD45RA	PE/Cy7	304125
CD45RO	PE	304205
CD62L	FITC	302611
CD64	PerCP/Cy5.5	305023
CD69	FITC	310903
CD8	PerCPCy5.5	300923
CD80	PE/Dazzle	305229
CD86	PerCPCy5.5	305419
Immunglobulin D (IgD)	APC/Cy7	348217
Streptavidin	FITC	405201
TSLPR	APC	322807

Alle in Tabelle 11 aufgelisteten Antikörper wurden von Biolegend (San Diego, CA, USA) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Antikörper gegen menschliche Zellen.

10.3 Marker zur Bestimmung der Immunzellen

Tabelle 12: Liste der verwendeten Marker zur Bestimmung der Immunzellen

Marker	Immunzellen
hCD45 ⁺	Humane Leukozyten
mCD45 ⁺	Murine Leukozyten
CD14 ⁺	Monozyt
CD14 ⁺ CD64 ⁺	FcγR1 exprimierender M1 Monozyt
CD14 ⁺ TSLPR ⁺	TSLPR exprimierender Monozyt
CD14 ⁺ CD1a ⁺	CD1a exprimierender Monozyt
CD14 ⁺ CD163 ⁺ CD206 ⁺	M2 Makrophage, Scavenging Zelle
CD14 ⁺ CD252 ⁺	(CD252 exprimierender) Monozyt
CD4 ⁺	T-Helferzelle
CD4 ⁺ CD103 ⁺	Regulatorische Schleimhaut T-Zelle
CD25 ⁺ CD127 ^{low}	Regulatorische T-Zelle
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD62L ⁻	Naïve CD4/CD8 Zelle
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD62L ⁺	Zentrale T-Gedächtniszelle
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD62L ⁻	Effektor T-Gedächtniszelle
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD62L ⁻	Effektor T-Zelle
CD4 ⁺ CCR4 ⁺	Th2, regulatorische Effektor T-Zelle
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺	Th1-Zelle
CD4 ⁺ CCR4 ⁺ CCR6 ⁻	Th2
CD4 ⁺ CCR4 ⁺ CCR6 ⁺	Th17
CD4 ⁺ CCR4 ⁺ CCR6 ⁺ CCR10 ⁺	Th22
CD8 ⁺	Zytotoxische T-Zelle

Marker	Immunzellen
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺	Naive B-Zellen
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺	<i>Early memory</i> B-Zelle
CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻	<i>Affinity-matured</i> B-Zelle
CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻	<i>Unconventional memory</i> B-Zelle
CD19 ⁺ CD38 ⁺	Plasmazelle
CD11b ⁺	Konventionelle dendritische Zelle
CD11b ⁺ CD80 ⁺	Konventionelle reife dendritische Zelle
CD11b ⁺ TSLPR ⁺	Konventionelle, TSLPR exprimierende dendritische Zelle

10.4 Patientenfragebogen mit SCORAD Schema

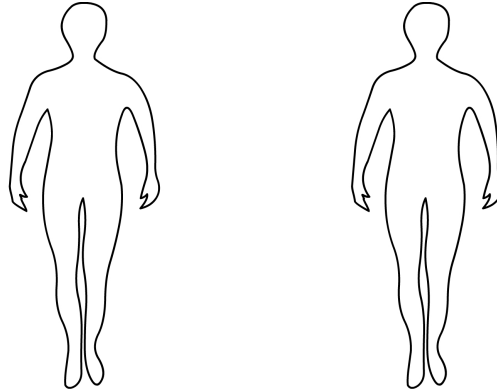
1. Art der Allergie:
 - Neurodermitis
 - Rhinitis allergica
2. Wann war das erste Auftreten Ihrer Allergie/Neurodermitis?
 - Alter _____
3. Wie häufig zeigen sich die Symptome Ihrer Allergie/Neurodermitis?
 - monatlich
 - jährlich
 - konstant
4. Wird Ihre Allergie / Neurodermitis zur Zeit therapiert?
Ja / Nein
5. Seit wann und wie? _____
6. Hilft diese Behandlung normalerweise bei Ihnen und wie schnell?
Ja / Nein

Nach _____ Tagen
Nach _____ Wochen
Nach _____ Monaten
7. Kommen folgende Erkrankungen in ihrer Familie vor?
Allergien Ja / Nein
Asthma Ja / Nein
Darmerkrankungen Ja / Nein
Hauterkrankungen Ja / Nein
8. Können Sie die einzelnen allergie-/neurodermitisfreien Phasen verlängern und was machen Sie dafür?

Ja / Nein

9. Leiden Sie zur Zeit an folgenden Erkrankungen?
 - Hautinfektion, seit _____
 - chronische Darmentzündung, seit _____
 - Diabetes, seit _____

10. Bitte malen Sie die zur Zeit bei Ihnen betroffenen Bereiche an:



11. Bevor Sie erkennbare Symptome der Allergie/Neurodermitis (Hautschädigung, Niesen, Husten) haben, können Sie manche von folgenden Veränderungen feststellen/spüren?

Wie lange vor dem Ausbruch der Symptome machen sich folgende Veränderungen bemerkbar?

- **Wärme im betroffenen Bereich** ___Tage vor dem Ausbruch
- **Leichte Anspannung der Haut** ___Tage vor dem Ausbruch
- **Rötung** ___Tage vor dem Ausbruch
- **Trockene Haut** ___Tage vor dem Ausbruch
- **Kribbeln ohne sichtbare Hautschädigung** ___Tage vor dem Ausbruch
- **Irritationen bei Reibung** ___Tage vor dem Ausbruch
- **Irritation bei kalt/warm Umstellung** ___Tage vor dem Ausbruch

12. Was sind die ersten Symptome mit denen sich ein Schub bei Ihnen ankündigt?

Alter: _____ Geschlecht: _____

A: Ausmaß der Hautläsionen			
Kopf	%	x 0.09 =	
Linker Arm	%	x 0.09 =	
Rechter Arm	%	x 0.09 =	
Linkes Bein	%	x 0.18 =	
Rechtes Bein	%	x 0.18 =	
Rumpf Vorderseite	%	x 0.18 =	
Rumpf Rückseite	%	x 0.18 =	
Genitalbereich	%	x 0.01 =	
		Σ =	
B: Intensität einzelner Symptome (0-3)			
Erythem			Score: 0= nicht vorhanden 1= gering 2= mäßig 3=stark
Ödem-/ Papelbildung			
Nässen / Krustung			
Excoriationen			
Lichenifikationen			
Hauttrockenheit*		Σ =	*nur in nichtläsionalen Arealen einschätzen
C: Subjektive Symptome (0-10)			
Juckreiz			
Schlaflosigkeit		Σ =	
A/5 + 7B/2 + C=		=SCORAD=	

10.6 Tabellen zur statistischen Auswertung

Kürzel	AD1	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD11	AD12	AD13	AD14	AD15	AD16	AD17	AD18	AD19	AD20	AD21	AD22	AD23	AD24
Sex	W	W	W	W	M	M	W	M	W	W	W	W	W	M	M	W	W	M	W	M	M	W
Diagnose	AD	AD	non-AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
FACS																						
CD14	6,71	3,04	7,05	4,93	0,066	0,095	3,07E-03	0	14,9	6,64	1,26	12,8	26,5	21,4	1,61	0,17	0,67	3,14	1,47	2,28	3,86	0,69
CD16	3,38	5,14	6,42	3,86	4,8	3,26	16,8	0	1,38	15,2	20,6	14,3	2,99	0,43	0,53	18,6	1,86	2,51	1,88	0,2	6,22	7,21
CD14_CD16	0,16	1,95	2,21	3,01	3,73	4,97	0,18	0	5,56	7,01	9,11	10,1	2,56	72,4	4,17	1,17	4,51	4,36	1,68	7,61	10,7	8,87
CD14_CCR2	91,2	52,2	51,9	0,8	100	100	0	0	3,18	13,3	15,8	45,4	5,32	0,21	0,72	2,38	1,28	2,59	3,21	14,2	4,31	3,61
CD14_CD64	79,4	74,2	78,2	11,8	97,5	94,3	0	0	15,9	11,8	18,1	31,5	37,2	0,41	5,32	1,19	3,85	3,14	2,7	38,5	0,43	0,52
CD14_CD206	5,29	4,48	26,3	1,03	0	0	50	0	0	0,031	0,19	0,35	0,39	0,033	0,86	0	1,28	0,2	0	26,8	0,085	0
CD14_CD163	79,9	61,3	96,1	3,33	25	37,7	0	0	0,093	0,12	0,19	2,83	2,37	0,044	1,29	1,19	2,14	1,89	2,53	17,1	0,26	0,52
CD14_CD206	5,29	4,48	26,3	1,03	0	0	50	0	0	0,031	0,19	0,35	0,39	0,033	0,86	0	1,28	0,2	0	26,8	0,085	0
CD14_CD206_CD163	14	7,02	43,1	17,8	0	3,77	50	0	40,6	25,1	50,5	29,8	34,9	0,98	48,1	11,9	49,6	18	15,4	84,9	17,2	9,79
CD14	9,33	7,81	43,4	35,5	4,51	5,42	3,76	45,5	33,5	9,43	7,89	10,6	6,55	13,7	6,63	7,26	6,07	5,69	7,48	9	12,8	7,16
CD14_CD1a	0,44	68,9	3,79	3,54	47,7	14,6	29,8	4,63	70	92	94,3	76,2	9,12	29	68,1	89,9	81,5	60,2	5,07	81	59	42,9
CD14_CD80	69,7	55,7	28,1	90	92	96,5	25,4	90,3	90,5	94,3	92,3	98,6	90,6	96,7	89,4	98,3	95,6	93,8	96,3	99,5	99,3	95,9
CD14_TSLPR	0,28	0,31	74,2	3,11	0,26	0,13	1,16	0,41	0,74	0,22	11,7	0,54	1,95	4,04	2,21	0,4	1,05	0,47	0	86,8	0,44	29,9
CD14_CD252	22,1	73,1	28,4	87,8	99,6	99,8	99,6	95,7	94	99,7	99,8	95,9	99	97	98,9	99,9	99,4	92,6	98,8	99,4	99,5	99,4
CD14_CD45RA	67,9	7,76	71,4	16,6	2,29	0,1	0	37,9	3,97	10,6	0,17	8,46	6,58	63,9	2,65	9,17	2,61	16	35,8	5,78	36,8	29,5
CD4_effectorcells	0,12	74,4	0,12	24,2	16,5	0	0	0,1	0,72	0	18,8	7,92	0	41	0	1,69	5,19	0,63	0,71	3,1	23,8	19,8
CD4_naiveCD4	7,22	3,16	81,8	32,7	35,9	25	0	16,6	96,4	74,8	12,5	61,6	91,4	3,57	98,6	70,7	62,2	84,5	44,4	80,5	33	42,2
CD4_CD45RO	21,5	20,3	0	1,21	0,044	0	1,38	6,14	0,58	0,42	0,11	0,028	1,26	7,44	0,61	0,017	0,077	0,55	5,24	0,12	0	0
CD4_centralmemory	1,79	2,11	0	35,4	0	0	12,8	31,2	15	16,7	10	0	59,5	16,2	43,8	0	25	11,4	8,87	75	0	0
CD4_effectormemory	25,1	72,3	0	16	0	0	27,7	11,2	45	5,0	20	25	6,33	22,1	18,8	0	25	70,5	32,3	16,7	0	0
CD8	4,6	0,63	1,26	0,21	6,46	4,09	2,18	10,6	4,16	1,2	10,9	13,5	5,49	7,08	1,15	0,91	0,084	2,73	0,056	3,47	0,58	2,69
CD8_CD45RA	86,9	3,21	81,1	10	0	0	0	29,9	5,17	2,61	0	0,22	8,25	1,69	2,81	0,23	0	38,8	9,52	0	42,9	44,8
CD8_RA_CD62	96,7	30,8	11,4	75	0	0	0	65,6	3,85	6,25	0	52,6	7,5	9,26	7,14	100	0	10,5	50	0	31	22,7
CD8_naiveCD8	1,09	0	77,8	0	0	0	0	27,9	76,9	31,2	0	10,5	91,7	0	42,9	0	0	70,5	0	0	24,7	29,3
CD8_CCR7	0	7,69	3,6	0	0	0	0	0,33	76,9	0	0	15,8	0,83	1,85	28,6	0	0	1,89	0	0	10,1	17,2
CD8_effectorcells	2,26	61,5	7,21	25	0	0	0	6,21	10,3	6,25	0	21,1	0	88,9	21,4	0	0	17,2	50	0	34,2	30,8
CD8_CD45RO	1,49	6,42	0	7,5	13,4	8,65	12	63,6	0,27	6,25	58,7	2,92	3,71	25,7	7,23	18,9	4	1,07	0	15,1	0	0
CD8_RO_CD62	57,9	0	0	0	31,9	44,4	24,5	24,1	0	0	0,84	8,5	0,93	18,2	0	1,23	0	0	0	14,9	0	0
CD8_centralmemory	5,26	0	0	0	9,69	13,6	4,2	5,12	0	0	5,15	19,4	3,7	1,59	0	4,94	0	5,26	0	31,3	0	0
CD8_RO_CCR7	0	7,69	0	0	28,1	26,6	6,29	7,13	75	14,8	64	38,9	36,1	1,22	44,4	64,2	0	5,26	0	29	0	0
CD8_effectormemory	36,8	92,3	0	100	30,4	15,4	65	7,65	25	85,2	30	33,2	59,3	79	55,6	29,6	100	89,5	0	24,7	0	0
CD4	91,1	14,2	42,1	28,8	14,1	17,2	2,18	22,6		22,2	23,4	26,3	38,4	16,1	6,9	2,1	11,6	9,24	8,98	14,4	20,7	14,2
CD4_CD25	69,4	12,9	71	24,3	99,9	100	12	30,2		81,8	99,9	97,7	45,2	73,8	81,3	98,9	46,1	18,7	13,2	99,5	99,7	99,7
CD4_CD69	0,15	1,22	3,31	15,2	17,9	13,5	14,3	3,09		3,64	50	23,1	7,72	6,8	9,55	8,52	14,7	1,34	0,9	50,3	5,64	47,1
CD4_CD103	96,4	1,95	74,7	5,8	0,69	0,27	24,7	1,15		1,1	22	7,46	11,5	0,53	5,45	7,23	7,66	0,64	0,31	13,7	0,66	1,05
CD4_134	3,14	4,49	26,5	72,7	99,7	99,9	42	54,1		97,9	99,8	48,1	87,6	76,4	98,4	98,5	59,1	52,2	32,7	93,5	67,1	95,7
Treg (CD25_CD127low)	0,1	49	0	3,58	8,82	9,46	2,04	10,6		10,6	98,9	92,1	12,3	4,7	20,8	95,9	20,2	15,2	11,5	98,7	98,6	97,6
CD11b	9,16	1,09	1,44	2,89	1,41E-03	0	0,25	7,63	0,18	0,12	0,055	0,32	4,66	3	0,67	1,00E-02	0,86	3,22	1,45	0,46	0	0
CD11b_CD1a	0,31	81,9	49,3	3,72	0	0	13	6,29	16,4	58,1	82,6	60,3	38,2	19,8	43,7	40	47,7	22,7	0,73	33,4	0	0
CD11b_CD252	17	73,4	91,9	97,8	0	0	94,8	73,2	86,6	77,4	91,3	53,8	73,1	67,6	86,6	80	82,5	67,7	72,5	57	0	0
CD11b_TSLPR	0,19	0,7	0,83	0,51	0	0	4,55	0,056	82,3	0	21,7	0,5	1,9	0,2	1,06	0	0,2	0,05	0	3,75	0	0
CD11b_CD80	71,9	8,98	76,8	60,3	0	0	26,6	68,5	46,3	72,6	69,6	79,9	69,4	27	60,2	100	55,9	62,7	51,8	86	0	0
CD11b_CD80_CD252	18,3	73,4	95,7	97,3	0	0	92,7	78,1	83,9	86,7	87,5	60,4	73,4	70,2	88,9	80	84,9	72,4	79,2	65,9	0	0
CD11c	54	11,7	46,4	65,1	9,6	4,08	22,8	57,1	2,99	85,1	86,2	75,6	66,5	7,9	82,5	85,3	75,3	69,8	72,1	73,4	90,9	92,3
CD19	75,4	76,9	71,4	81,9	92,9	92,7	92,3	85,2	93	90,3	98	97,2	91,8	96,9	90,5	94,6	89,5	91,3	90,4	98,2	97,5	97,5
CD19_CD27	43,5	21,2	0,082	40,8	25,8	24,8	10,6	33,7	25,1	34,5	48,4	66,9	49,4	83,2	15,3	26,6	18,1	18,7	12,6	22,5	33,4	13,7
CD19_CD27_igD	5,24	6,07	80,6	16,4	78,6	62,6	1,65	1,48	5,15	16,8	47,6	60,6	1,87	11,4	9,4	33,4	10,6	0,8	0,83	70,5	10,5	25
CD19_CD27_igDn	21	93,3	19,4	82,3	18,7	34,4	88,1	97,7	94,2	78	42,6	24,8	97	87,9	89,5	63,8	87,7	99	99,1	26,6	86,5	68,7
CD19_CD27_igM	16,8	10,4	2,78	41,2	20,1	9,34	67,6	39,1	1,68	0,65	2,57	4,45	3,8	5,82	0,84	3,92	0,22	0,19	0,14	28,6	4,13	13
CD19_CD27_igMn	79,4	86	97,2	42,2	75,1	87,8	28,3	41,8	94,3	96,3	93,1	77,6	88,3	93,3	97	93,5	99	98,8	99,2	61,5	93,3	80,3
CD19_CD27n	54,5	78	99,9	56,7	71,4	73,2	87,1	64,2	72,6	63,6	49,5	31,2	48,1	12,5	82,7	69,7	80,8	78,1	85,9	77	64,6	84,9
CD19_igG	0,026	0,028	0,05	2,67	0,58	0,38	0,13	0,14	19,5	0,75	2,88	8,15	0,84	0,81	2,18	9,57	1,7	0,31	0,18	0,37	0,51	0,12
CD19_igGn	100	98,9	99,9	97,3	99,4	99,6	99,5	99,8	80,5	98,7	97,1	91,8	99,1	99,2	97,8	90,4	98,3	99,7	99,8	99,6	99,5	99,9
CD19_CD27n_IgD	0,48	11	0,00915	3	8,78	13,3	9,02	2,46	4,34	5,34	0,27	18,9	3,81	1,5	2,92	0,71	1,23	1,41	1,84	2,22	0,3	2,12
CD19_CD27n_IgDn	67,3	87,9	100	96,1	84,8	79,5	84,9	96,9	95,2	93,7	97,6	56	95,4	98,1	95,7	98,4	98,6	98,3	98	97,2	76	80,3
CD19_CD27n_IgM	19	9,13	0,00457	37,2	11,7	5,9	61,7	36,6	2,83	0,64	0,062	1,27	4,29	85,6	1,07	0,12	0,38	0,22	0,12	14,4	0,24	0,41
CD19_CD27n_IgMn	80	90,1	100	61,6	86,9	92,8	37,4	62	97,1	99,3	99,6	93,1	95,5	8,75	98,9	99,9	99,6	99,8	99,9	84,6	98,9	98,5
CD19_IgG	0,026	0,028	0,05	2,67	0,58	0,38	0,13															

Maus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Datum Rekonstitution	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19	22.10.19
Donor	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1	AD 1
Behandlung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO
Klinischer Score	0	0	0	0	3	3	2	0	0	6	0	0
Histo Score	0	0	0	0	12	11	6	4	4	12	10	11
Haut Score	0	0	0	0	2	3	3	0	3	2	4	1
FACS												
hCD45	14,2	20,4	33,7	17,8	21,4	22,7	15,5	14,2	14,1		8,38	7,36
mCD45	0,7	0,93	0,12	0,54	0,69	0,063	5	8,14	7,33		26,5	28,7
CD27neg	81,4	82,1	74,4	74,6	73,7	75,9	77,5	67	80,2		72,8	56,6
CD27negIgDneg	48,3	39,6	31,7	39,8	28,9	37,6	40	35,2	35,2		38,7	32,2
CD27negIgDpos	48	57,3	63,3	56,3	66,5	58,1	56	58,8	61		54,8	60,1
CD27pos	15,6	13,9	20,6	21,6	21,4	18,8	17,6	28,2	15,4		22,6	37,9
CD27posIgDneg	54,3	38,3	24,2	48,4	31,9	44,3	53,1	40	37,6		53,3	36,3
CD27posIgDpos	41,6	56,7	72,1	48,6	61,2	52,5	43,9	54	57,9		40,5	56
CD4	7,42	10,7	13,2	7,35	11,7	8,31	8,49	7,3	10,3		8,95	10,1
CD4CD45RA	1	0	0,044	0,16	0,11	0,045	0,047	0,19	0,13		0,13	0,54
CD4CD45RACD62neg CCR7+	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	11,1
naive CD4	0	0	0	66,7	66,7	100	100	33,3	0		33,3	44,4
CD4CD45RACD62LposCCR7neg	88,9	0	100	0	33,3	0	0	66,7	50		0	33,3
effector cells	11,1	0	0	33,3	0	0	0	0	50		66,7	11,1
CD4CD45RO	15,6	3,04	3,19	5,38	13,1	9,3	3,98	4,31	3,73		8,87	15,2
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos	1,42	5,63	2,74	15,4	4,34	5,8	2,35	1,47	0		5,03	5,16
central memory	8,19	60,6	76,7	53,8	89,4	79,2	78,8	20,6	62,7		48,2	78,6
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg	30,6	18,3	16,4	17,3	4,34	12,1	9,41	32,4	28,8		22,6	9,92
effector memory	59,8	15,5	4,11	13,5	1,9	2,9	9,41	45,6	8,47		24,1	6,35
CD8	0	0	0	0	4,17E-03	0	0	0	0		0	6,09E-03
CD14	23,9	27,9	32,7	30,2	36,3	33,7	37,8	39,7	42,7		35,6	31,7
CD14CD1a	23,9	37	39,1	21,8	32,4	15,7	15,3	12,9	17,3		25,7	20,6
CD14CD252	12,4	18,5	15,9	14,9	22,7	17,7	17,6	21,2	21,6		13,4	17
CD14TSLPR	1,57	2,72	3,21	1,82	2,45	2,18	2,33	1,38	2,03		1,51	1,73
CD14CD163	75,6	84,4	87,8	75,3	83,4	82,6	82,8	83,8	88		80,6	83,3
CD14CD206	28,1	31	35,5	32,5	38,6	32,5	44,3	65	45,2		30,6	30,7
CD14CD64	75,2	75,7	77,6	79,5	79,5	76,1	80,1	85,6	82,8		80,4	79,4
CD163CD206	31,8	35,4	40,7	33,9	40,9	37,6	44,9	56,3	45,4		32,2	34,9
CD16	6,08E-03	3,58E-03	0,016	0,015	0,029	6,63E-03	0,016	0,27	0,068		3,08E-03	0,026
CD4CD69	32	32,8	38,9	30	35	31,5	33,6	28,5	30		29,9	29,6
CD4CD103	22	22,6	25,7	21,6	24,1	21,8	23,8	19,9	19,3		20,4	19,9
CD4CD134	4,66	5,43	5,19	5,45	7,73	6,09	14,4	10,3	10,6		9,97	12
CD25CD127low	0,84	0,23	0,15	0,092	0,24	0,14	0,29	0,57	0,31		0,44	0,45
CD4CCR7	55,7	63,7	56	57,1	69,7	71,1	67,2	62,2	68,6		72,9	74,5
CD4CCR7neg	41,9	33,7	41,1	40,3	28,2	27	30,6	35,4	29,4		25,3	23,8
CD14	27,7	37,7	46,2	32,8	39,7	34,4	34	40,9	45,1		32,5	33,2
CD14CD64	72,6	75,8	75,1	75,3	77,2	76,3	76,5	73,2	74,1		74	74,4
CD15CD206	19,3	25,1	28,2	22,6	25,4	26,4	23,9	29,5	31,2		22,1	23,4
CD4CD252	40,7	46,9	41,3	30,9	62,6	24,6	23,1	46	54,5		22,1	15,2
CD19	52,6	56,7	56	52,6	50,8	75,4	73,5	74,5	74,7		70,8	73,8
CD19CD38	8,59	15,9	13,8	9,66	9,12	38,3	32,6	37,5	31,5		28,3	30,8
CD19CD38CD252	56,2	62,7	83,7	60,5	84,7	44,9	44,9	69,2	76		41	39,1
CD19CD252	40,1	50	72	50,1	66,3	58	56,6	71	74,1		54,3	51,7
Luminex												
MCP3	909,5	2019	385	411	12019	10835,5	4435,5	4349,5	8621		3484,5	6889
TSLP	114	54	39	30	1432	1146,5	993	394	1519,5		226,5	1451
IL-4	77	76	20	77	30,5	30	23	38	50,5		39	42
IL12p70	28	27,5	15	11	14	17	13	18	12		20	24
IL17A	28	28	28,5	18	18	22	18	16	22		29,5	18

Maus	1	2	3	4	5	6	13	14	15	16
Datum Rekonstitution	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20
Donor	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3
Behandlung	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO
Klinischer Score	2	0	1	6	6	2	5	2	0	6
Histo Score	4	1	0	4	3	5	4	4	4	4
Haut Score	1	0	0	1	0	3	1	1	0	0
FACS										
hCD45	16,7	14,6	18,5	21,6	14		18,4	18,9	14,4	15,9
mCD45	6,12	10,2	9,68	5,98	11,9		9,52	8,12	13	10,6
CD27neg	36,5	26,7	30,7	26,2	31,7		29,1	32,4	28,9	32,7
CD27negIgDneg	64	45	48,6	43,8	47,8		43,3	58,3	44,4	49,3
CD27negIgDpos	35	53,2	49,6	54	49,6		54,6	40,3	53,2	48,3
CD27pos	62	71,8	67,6	72,2	66,6		69,4	66	69,6	65,7
CD27posIgDneg	22,4	35,6	37,4	36,9	32,6		36,5	32,9	37,2	37,6
CD27posIgDpos	71,9	62	61,1	61	66,3		61,8	62,6	62,2	61,6
CD4	15,8	11,2	7,01	11,5	6,72		6	15,5	5,2	6,26
CD4CD45RA	0,92	1,2	0,79	0,32	1,12		1,04	0,14	0,33	0
CD4CD45RACD62negCCR7+	6,45	14,3	0	16,7	20		15,8	0	33,3	0
naive CD4	61,3	35,7	55,6	66,7	40		57,9	60	66,7	0
CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells	12,9	32,1	11,1	16,7	20		10,5	20	0	0
CD4CD45RO	19,4	17,9	33,3	0	20		15,8	20	0	0
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory	6,21	14,8	12	8,97	13,6		21,3	13,8	21,9	18,5
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory	11,4	14,5	10,3	18	5,74		18,3	29,7	4,52	0
CD8	80	68,9	67,6	57,5	92,6		78,9	54,8	92,5	100
CD14	3,81	6,1	12,5	8,38	0,82		0,51	3,39	1,01	0
CD14CD1a	4,76	10,5	9,56	16,2	0,82		2,31	12,2	2,01	0
CD14CD252	0,11	0,19	0,099	0,099	0,16		0,069	0,23	0,39	0,46
CD14TSLPR	37,3	40,3	34,9	38,7	37,7		43,4	44,9	39,8	34,1
CD14CD163	36,4	21,5	23,1	16,7	22,2		21,6	36,3	27,9	25,8
CD14CD206	28,5	17,8	16,6	14,3	11,5		14,5	20,4	13,1	11,2
CD14CD64	1,01	2	1,21	1,12	1,89		1,68	1,42	1,81	1,58
CD163CD206	71,6	75,8	70,7	66,5	75,7		69,9	58,4	74,2	75,5
CD16	51,5	69,3	55,2	60,4	71,8		67,2	59,6	68,7	67,6
CD4CD69	74,4	78,8	72,2	77,5	80,3		76,7	76,7	75,4	76
CD4CCR7	42,1	56,7	46,4	45,1	57,5		51,2	35,3	52,2	54
CD4CCR7neg	1,02	1,08	0,17	0,45	0,36		0,38	0,76	0,92	0,58
CD14	23,4	40,9	28,6	32,3	37,2		30,5	20,9	35,1	34
CD14CD103	21,1	34	24,2	27,5	31,5		27	19,7	28,8	30,5
CD14CD134	23,1	25,9	19,3	19,3	8,62		15	19	16,2	13,5
CD25CD127low	2,59	1,07	1,08	0,91	0,26		0,59	1,84	0,33	0,53
CD4CCR7	78,5	84,6	80,1	81	87,4		84,3	81,4	87	83,1
CD4CCR7neg	17,9	14	18,1	17,6	11		14,4	16,8	12	15,5
CD14	41,9	35,1	30,8	34,7	25,7		39	48,2	31,4	35,5
CD14CD64	72,4	79,4	71,8	73,2	81,1		79,3	78	82	81,5
CD15CD206	14,8	22,2	15,7	17,2	14,8		24,3	20,4	16,2	20,5
CD4CD252	33,8	46,7	40,6	31,5	44,9		35,9	28,8	46,8	52,9
CD19	57,8	62,1	58,7	61	68,1		63,2	62,6	65,2	60
CD19CD38	18,8	20,7	19	21,3	22,8		18,3	17,6	16,7	11,1
CD19CD38CD252	52,3	58,5	52,9	42,5	57,2		52,8	56,9	60,2	64,2
CD19CD252	44,8	50,3	43	39,9	56,2		52,6	58,5	54	52,7
Luminex										
MCP3	500,5	248	1221	199	1702		3152	1884	1645,5	168,5
TSLP	149	66	41,5	80	99		1350	63	49	70
IL-4	23	32	18	43	28		14	21	12	14
IL12p70	14	32	14	19	20		15	21	13	15
IL17A	18	34	17	19	29,5		14	19,5	16	24

Maus	17	18	19	20	21	22	23	24
Datum Rekonstitution	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20	20.02.20
Donor	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3	AD 3
Behandlung	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung
Klinischer Score	4	6	0	0	0	0	0	0
Histo Score	4	4	1	0	1	1	1	2
Haut Score	1	2	2	0	0	0	0	0
FACS								
hCD45	16,4	16,4	12,9	13,3	11,9	14,1	12,6	12,8
mCD45	12,8	13,7	15,1	15,6	16,6	14,8	14,5	19,1
CD27neg	28,3	30,6	28	30,2	31,5	27,5	28,1	24,4
CD27negIgDneg	42,3	39,7	41,8	39,4	38	35,5	39	35,3
CD27negIgDpos	55,4	58,1	56,4	58,5	60	62,9	59,1	62,6
CD27pos	70,2	68,1	70,7	68,5	67,3	71	70,8	74,4
CD27posIgDneg	39,2	29,8	29,3	37,2	31	34	30,9	29,1
CD27posIgDpos	59,7	68,4	68,4	61,6	67,9	64,8	67,5	68,8
CD4	8,38	6,79	11,4	12	9,24	5,76	6,38	11,9
CD4CD45RA	0,79	0	0	0	0	0	2,82	0
CD4CD45RACD62neg CCR7+	0	0	0	0	0	0	0	0
naive CD4	100	0	0	0	0	0	50	0
CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells	0	0	0	0	0	0	50	0
CD4CD45RO	22,8	7,07	19,4	16,5	25	11,8	11,3	14,3
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory	6,9	0	14,3	0	29,6	0	0	21,4
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory	86,2	100	85,7	69,2	51,9	100	100	71,4
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory	6,9	0	0	23,1	11,1	0	0	7,14
CD8	0,26	1,03	1,58	0,15	0,68	0,23	0,54	0,36
CD14	43	41,5	45,4	46	45,7	44	45,1	51,3
CD14CD1a	19,5	27,4	31	32,8	25,7	27,4	35,2	31,8
CD14CD252	10,4	12,7	16,3	18,4	14,1	13	17,6	17,2
CD14TSLPR	1,14	2,86	3,38	5,24	3,02	4,21	3,41	2,61
CD14CD163	74,2	64	75,5	78,9	66,1	67,3	73,4	75
CD14CD206	72,2	68,2	72,8	76,5	73,9	75,1	67,4	59,9
CD14CD64	78,9	62,7	69,4	73,3	68	69,3	64,8	66,8
CD163CD206	54	45,8	52,5	65,7	46,2	52,1	52	51,3
CD16	0,81	0,66	0,8	0,69	2,01	0,73	0,97	0,69
CD4CD69	35,5	31,8	38,6	46,7	28,9	33,6	29,9	34,6
CD4CD103	29,5	30,5	32,8	42,9	29,7	33,1	24,3	26,7
CD4CD134	15,4	9,03	15,1	17,9	11	18,1	18,8	17,6
CD25CD127low	0,75	0,43	0	0,83	2,03	1,13	1,06	1,62
CD4CCR7	86,7	85,6	88,3	90,4	87,2	89,9	86,9	89,4
CD4CCR7neg	11,9	13,1	10,9	8,56	11,3	8,71	11,8	9,26
CD14	39,2	36,1	32,7	32,1	33,1	31,6	37,3	34,3
CD14CD64	80,1	66,3	74,6	74,4	70,2	73,3	74,5	74,6
CD15CD206	23	30,2	25,4	23,9	25,5	25,2	26,9	23,7
CD4CD252	50,7	41,2	41,4	55,6	33,3	41,8	52,6	57,7
CD19	60,4	52,1	62,1	61,6	57,5	56,4	55,1	62,1
CD19CD38	14,6	12,4	16,5	17,1	20,5	15,5	15,5	20
CD19CD38CD252	58,1	70,1	70	72,7	67,7	64,7	63,2	66,5
CD19CD252	54,8	64,6	63,4	69,2	69,9	69,3	61,1	67,8
Luminex								
MCP3	632,5	456	44	2756,5	762	10020	193	5635,5
TSLP	55	44	24	38,5	39	49	33	32
IL-4	11	15	7	12,5	9	11,5	13	8
IL12p70	11	15	7	13	11	11	13	9
IL17A	13	15	9	14	12	12,5	13,5	10

Maus	1	2	3	4	5	6	13	14	15	16
Datum Rekonstitution	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20
Donor	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4
Behandlung	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO
Klinischer Score	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Histo Score	3	2	4	2	3	2	3	2	2	3
Haut Score	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0
FACS										
hCD45	26,9	19,4	18	17,1	14,2	15,3	20,3	19,9	20,3	17,3
mCD45	9,12	12,1	12,8	15,6	17,6	15,2	12,8	12,2	12,3	11,1
CD27neg	61,6	62,7	61	52,3	57,5	66,5	61,3	64,5	64,6	51,9
CD27negIgDneg	30,6	31,7	28,3	21,5	21,9	25,6	26,7	24,8	28,8	27
CD27negIgDpos	62,4	59,5	60,6	65,8	67,8	65,3	62,7	65,5	63,3	60,9
CD27pos	34	33,2	33,6	42,3	37,1	28,8	33,9	29,3	30,8	41,9
CD27posIgDneg	49,7	37,7	28,9	11	15,7	36,3	23,7	24,1	33,1	12,4
CD27posIgDpos	39,7	46,6	51,8	73,5	67,5	50,9	55,4	58,8	54,4	60,8
CD4	7,27	7,78	9,12	11,2	12,3	10,7	12,2	9,79	7,33	12,5
CD4CD45RA	2,57	3,56	2,48	4,57	6,04	2,35	4,94	5,48	2,77	4,76
CD4CD45RACD62negCCR7+	0	1,96	0	0	0	0	2,34	3,03	0	1,08
naive CD4	19,1	21,6	19,2	12,2	9,79	26,8	37,5	21,2	34	29
CD4CD45RACD62LposCCR7neg	80,9	76,5	76,9	84,1	87,4	65,9	59,4	69,7	60,4	62,4
effector cells	0	0	3,85	3,66	2,8	7,32	0,78	6,06	5,66	7,53
CD4CD45RO	3,61	3,49	4,19	3,34	2,96	3,45	5,83	6,6	6,28	6,39
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos	13,6	8	11,4	8,33	14,3	10	29,8	20,1	13,3	13,6
central memory	1,52	4	12,5	10	1,43	16,7	34,4	45,9	49,2	48,8
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg	31,8	40	31,8	35	31,4	33,3	15,9	17	20	19,2
effector memory	53	48	44,3	46,7	52,9	40	19,9	17	17,5	18,4
CD8	0,092	0,34	0,14	0,031	0,099	0,098	0,2	0,24	0,27	1,19
CD14	46,3	37,7	40,6	48,2	52,4	38,7	55,1	52,5	49,1	50,9
CD14CD1a	8,22	9,05	11,5	12,3	11,2	11,1	58,4	49,5	36,1	3,19
CD14CD252	8,51	13,5	13,1	20,6	17,1	9,34	33,5	15,6	9,6	9,62
CD14TSLPR	1,67	1,66	1,84	1,63	1,74	1,52	1,36	1,41	1,51	2,19
CD14CD163	79	78,2	77,9	86,8	83	86,1	73,3	56,7	47,1	37,6
CD14CD206	38	29,5	30,4	32,7	24,2	37	36,8	31,2	26,5	17,4
CD14CD64	72,3	69	68	66,2	65,3	76,3	69,9	72	71,5	60,3
CD163CD206	36,8	28,2	29,3	33,7	25,3	35,3	30,1	18,5	12,3	8,01
CD16	0,088	0,14	0,16	0,62	0,27	0,17	1,69	10,6	11,5	5,15
CD4CD69	33,7	26,3	27,9	24,4	21,6	22,7	26,8	26,5	29,1	15,3
CD4CD103	3,13	3,08	3,06	2,84	3,17	15	1,98	1,96	2,35	3,26
CD4CD134	18,2	21,6	25,2	25,5	28,5	0	9,29	14,8	18,6	28,7
CD25CD127low	0,73	1,78	1,88	2,49	2,79	0	0,58	0,87	0,95	3,98
CD4CCR7	58,4	45,8	53,2	56,9	47,7	55,5	56,6	61,8	67,3	65,1
CD4CCR7neg	39,6	52	45	41,1	49,8	42,4	41,1	36,1	31,2	33,4
CD14	21,9	26,1	33,2	47,9	60,8	40,7	56,3	44	55,7	55,7
CD14CD64	78,5	77,4	75,9	74,8	71,9	77,8	74,8	73,5	71,7	72,5
CD15CD206	12,1	7,99	12,3	14,1	25,6	23,2	42,9	31,5	36,4	35
CD4CD252	22	17,5	20,4	16,9	15,9	15,8	8,65	15,6	16,7	6,62
CD19	60,4	55,1	59,9	62,5	59,5	63,3	69,1	60,4	61,3	56,9
CD19CD38	21,5	21,1	23,5	27,3	24,9	20,5	34,6	27,2	27,5	28,2
CD19CD38CD252	29,2	36,7	35,9	48,3	46	35,3	17,4	28,3	25,2	25
CD19CD252	21,8	27,2	31,8	46,8	48,7	33,1	21,8	24,9	21,7	32,1
Luminex										
MCP3	571,5	622	875,5	476,5	303,5	1784	594,5	239,5	1903	556
TSLP	214	170	114,5	61	129	99	103,5	101	59	76
IL-4	40	13	22	28	21	48	11	9	7	9
IL12p70	24	9	15	14,5	11	38,5	11	8	7	8
IL17A	29	10	17	16	13	51	12	7,5	8,5	9

Maus	17	18	19	20	21	22	23	24
Datum Rekonstitution	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20	12.03.20
Donor	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4	AD 4
Behandlung	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung	Kontrolle, keine Sensitivierung
Klinischer Score	0	0	0	0	0	0	0	0
Histo Score	4	6	2	2	2	2	2	2
Haut Score	0	0	0	0	0	0	0	0
FACS								
hCD45	17,8	16,8	19,8	26,1	23,1	19	19,6	19,2
mCD45	13,2	14,5	12,2	11	11,2	11,8	11,9	12,5
CD27neg	47,9	64,2	63	57,9	59,8	59,9	64	66,1
CD27negIgDneg	20,2	29,3	28,3	28,6	28,3	26,6	27,6	26,5
CD27negIgDpos	65	64	62,7	62,4	60,1	62,9	64,2	66,1
CD27pos	45,8	31,2	30,8	37,2	35,1	34,5	30,8	29
CD27posIgDneg	8,46	34,4	35,5	45,9	29,7	31,3	32,6	37,7
CD27posIgDpos	69,1	52	48,7	36,5	44,2	49,2	50,6	51,1
CD4	16,9	7,12	7,59	8,67	8,85	7,65	6,29	9,49
CD4CD45RA	4,12	4,81	3,4	3,91	5,64	2,16	3,04	1,63
CD4CD45RACD62negCCR7+	1,03	0	0	1,11	0,68	3,77	0	66,7
naive CD4	12,4	18,3	13,7	38,9	23	24,5	25	16,7
CD4CD45RACD62LposCCR7neg	84,5	80,5	84,9	55,6	74,3	69,8	73,3	0
effector cells	2,06	1,22	1,37	4,44	2,03	1,89	1,67	16,7
CD4CD45RO	10,3	6,45	4,29	4,18	6,44	4,16	7,05	37,4
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos	4,12	18,2	14,1	19,8	21,3	15,7	15,8	61,6
central memory	56	20	12	17,7	15,4	16,7	12,2	9,42
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg	23,5	31,8	23,9	22,9	25,4	28,4	27,3	4,35
effector memory	16,5	30	50	39,6	37,9	39,2	44,6	24,6
CD8	0,42	0,26	0,053	0,1	0,23	0,21	0,37	8,2
CD14	50	48,1	56,2	48,6	47,9	43,1	44,1	44,5
CD14CD1a	7,51	3,66	43	14,5	32,6	9,96	8,39	8,9
CD14CD252	18,7	3,97	24,1	14,1	15,3	17,3	12	7,2
CD14TSLPR	1,09	1,25	1,15	1,36	1,33	1,58	1,1	1,28
CD14CD163	60,6	52,3	55,8	69	65,9	62,2	62,9	68,8
CD14CD206	26,3	31,7	36,5	40,8	36,3	39,8	34,3	38,7
CD14CD64	57,8	65,9	65,1	70,3	64,1	64,2	64,2	71
CD163CD206	17,8	15,9	23	33	25,3	29,1	25,8	30,2
CD16	6,1	4,25	1,33	0,24	0,42	0,34	0,28	0,2
CD4CD69	17,6	21,1	29,1	26,3	20,5	26,6	22,6	27,1
CD4CD103	2,91	2,44	1,81	1,96	2,64	1,85	1,31	1,56
CD4CD134	31,4	19,9	13,8	15,9	19,1	22,4	18	12,7
CD25CD127low	3,52	3,22	0,66	1,26	1,82	1,55	1,75	0,69
CD4CCR7	76,1	79,7	66,9	61,7	61	61,8	49,5	52,2
CD4CCR7neg	21,4	19,1	31,1	34,1	35,3	36,5	48,8	45,5
CD14	68,2	56,8	65,8	54,4	49,2	41,4	38,6	39,5
CD14CD64	68,5	70,7	70,6	70,9	72,8	73,6	73	72,3
CD15CD206	39,7	31,9	34,1	22,9	24	21,3	18,4	17,8
CD4CD252	8,68	9,79	13,7	31,5	41,9	18,5	72,5	39,8
CD19	58,6	66	66,9	68,6	63,9	59	51	60,5
CD19CD38	28,2	30,5	29,2	30,3	27,8	22,2	18,3	24,3
CD19CD38CD252	32,2	20	23,8	30,7	51,9	30,6	84,9	55,2
CD19CD252	41,2	21,6	21,7	37,7	53,8	27,4	75,2	57,1
Luminex								
MCP3	597	191	376	74	143	8	18	7
TSLP	53	54	31	38	32	10	11	10
IL-4	7	8	11	13	13	13	12	8
IL12p70	7	8	9	10	12	8	9	8
IL17A	8	8	11	12	16	9,5	9	10

Maus	1	2	3	4	5	6	19	20	21	23	24
Datum Rekonstitution	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20	11.05.20
Donor	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5	AD 5
Behandlung	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO
Klinischer Score	3	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0
Histo Score	3	2	3	3	2	3	4	5	3	4	5
Haut Score	0	1	0	0	0	2	1	0	1	2	1
FACS											
hCD45	17,4	17,8	23	16,1	13,3	14,2	19	19,2	16,8	15,5	19
mCD45	17,7	18,5	14,8	24,7	30,6	26,6	16,1	15,2	17,9	18,8	18,8
CD27neg	11,8	10,5	12	12,5	12,1	11,6	34	32,6	31,2	31,8	37
CD27negIgDneg	28,6	24,1	27,4	31,7	26,7	27,2	51,7	54,6	53,3	54,5	56,2
CD27negIgDpos	69,4	74,3	70,8	66,3	71,7	70,5	46,2	42,9	44,6	43,1	41,3
CD27pos	87,3	88,8	87,2	86,5	87,1	87,7	64,3	65,6	67,2	66,5	61,4
CD27posIgDneg	25,7	29,1	31,6	27,4	30,7	29,5	33,3	38,9	36,3	40,6	37,7
CD27posIgDpos	70,8	69	67,5	70,2	67,8	67,7	66	60,8	63	58,7	61,7
CD4	17,9	10,2	11,4	18,9	8,62	14	8,93	8,13	7,86	7,8	5,93
CD4CD45RA	0	0,047	0	0,032	0	0,074	0	0,06	0	0	0
CD4CD45RACD62neg CCR7+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
naive CD4	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	0
CD4CD45RACD62LposCCR7neg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
effector cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD4CD45RO	0,097	0	0,17	0,13	0,15	0,11	0,068	0,06	0,19	0,26	0,2
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos	0	0	33,3	25	100	0	0	0	33,3	0	0
central memory	0	0	0	0	0	66,7	0	0	0	0	0
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg	0	0	0	25	0	33,3	0	0	66,7	0	0
effector memory	100	0	66,7	50	0	0	100	100	0	100	100
CD8	0,77	0,51	1,18	1,97	0,84	1,68	0,51	0,4	0,37	0,29	0,25
CD14	64,8	57,8	63,2	64,1	71,2	73,2	59,6	65,9	61,6	67,1	63,1
CD14CD1a	12,1	12,1	8,37	20,4	6,86	10,3	20,3	19,4	22	21,3	21,9
CD14CD252	19,2	12,1	12,8	21,4	14,2	20,2	20,5	17,4	21,9	18,5	20,7
CD14TSLPR	1,43	1,6	1,06	2,14	1,21	2,02	2,61	1,73	5,78	2,18	2,39
CD14CD163	81,5	84,1	81,7	88,2	81,7	85	78,5	80,7	82,5	81,3	67,9
CD14CD206	65,1	82,1	81,1	82,4	74	83,1	60,8	68,6	62,5	66,1	42,6
CD14CD64	71,9	81,2	81,1	82,4	78	81,6	74,2	76,9	76,2	75	65,3
CD163CD206	56,6	61,6	57,7	68,3	56,8	63,5	51,5	55,3	57,5	55,6	38,9
CD16	3,85	12	12,9	15,2	3,22	13,4	0,89	1,81	0,85	1,05	0,22
CD4CD69	17	26,5	18,5	19,6	17,6	21,2	27,1	31,7	31,9	33,5	19,8
CD4CD103	28,1	27,4	24,9	22,7	22,5	27,7	24,5	29,9	30,1	32,8	19,9
CD4CD134	37,7	22,2	32,3	26,1	22,2	32,9	9,54	11,9	13,9	10,3	28,6
CD25CD127low	3	2,27	2,45	3,41	2,45	2,92	1,9	1,44	0,79	1,46	2,87
CD4CCR7	91,2	92,3	91,4	92,9	93	92	82,7	84,4	84	84,1	81,4
CD4CCR7neg	7,78	6,74	7,74	6	6,21	6,87	16	13,9	13,9	14,4	17,4
CD14	56,6	59	44,5	56	53,6	62,3	53,1	48,5	57,1	53,8	65,7
CD14CD64	86,7	87,1	84,3	86,2	86,2	87,3	87,7	86,8	88,4	87,1	88,4
CD15CD206	42,3	40,1	33,4	44,8	39,9	42,5	33,1	25,6	39,4	30,9	40,9
CD4CD252	17	18,2	15	20	15,3	21,6	23,2	20,3	23,7	22,5	22,5
CD19	76,7	79,7	77	76,8	81,8	82,3	79	79,6	79,7	80,3	80
CD19CD38	37,4	43,4	39,2	45,2	45,3	50	34,4	39,8	41,6	40,9	40,5
CD19CD38CD252	39,2	35,7	34,4	46,9	32	37,5	57	43,5	48,6	49,1	56,7
CD19CD252	58,3	60,3	56,3	67,1	60,9	64,7	68	63,7	65,2	66,2	68,7
Luminex											
MCP3	8	6	7	7	6	108	244,5	55	997	2461,5	608
TSLP	11	11	10	10	10	51	67	47	86	77	76,5
IL-4	20	29	48	19	14	14	13	20	15	19,5	15
IL12p70	12	10	10	10	13	11	10	11	12	16	10
IL17A	13	12	12	12	13	9	10	13	15	21	9,5

Maus	1	2	3	4	5	18	19	20	21	22	23
Datum Rekonstitution	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20	19.05.20
Donor	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9	AD 9
Behandlung	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO + Prednisolon oral 1 mg/kg	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO
Klinischer Score	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Histo Score		4	5	4	4	4	3	5	6	6	2
Haut Score	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0
FACS											
hCD45	15,5	16	15	14,8	10,4	35,7	16,3	13,3	14,8	11,2	14,5
mCD45	19,3	22	20	19,6	17,2	8,23	16,4	17,2	17,2	16,6	17,6
CD27neg	8,83	8,02	7,12	8,19	22	35	25,6	27,6	31,9	33,8	28,2
CD27negIgDneg	20,5	21,3	17,9	18,9	41,5	52,2	45,6	45,1	49,4	53,3	50,9
CD27negIgDpos	78,1	77,3	80,6	79,6	56,9	46	52,2	52,8	48,2	44,5	47,4
CD27pos	90,6	91,4	92,4	91,2	76,8	61,6	73	70,9	66,5	64,6	70,5
CD27posIgDneg	20,9	18,5	20,2	22,6	27,2	27,7	33,1	36,5	32,6	31,9	26
CD27posIgDpos	78,6	81	79,5	77	69,1	70,3	65,8	63,2	66,9	66,5	72,5
CD4	3,22	3,71	3,64	3,23	5,27	24,9	3,18	1,18	8,21	5,66	4,47
CD4CD45RA	0,14	0,15	0	0	0	0,053	0	0	0	0	0,16
CD4CD45RACD62negCCR7+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
naive CD4	100	100	0	0	0	100	0	0	0	0	100
CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD4CD45RO	0	0	0	0	0	0,053	0	0	0	0	0
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory	0	0	0	0	0	33,3	0	0	0	0	0
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory	0	0	0	0	0	33,3	0	0	0	0	0
CD8	1,06	1,76	2,24	1,83	2,27	1,94	0,53	0,36	0,89	0,33	0,46
CD14	47,6	49,4	49,7	50,1	48,7	44	42,1	40,9	39,2	36,9	39,2
CD14CD1a	22,9	32,5	24,7	25	23,1	17,5	25,1	17,3	19,1	22,6	29,6
CD14CD252	17,4	24,4	17,9	17,3	18	15,5	15,9	13	14,5	16,8	20,8
CD14TSLPR	1,88	2,01	1,89	1,4	1,07	1,03	1,62	1,49	1,59	1,91	2,43
CD14CD163	71	75,8	74,1	71,5	71,8	52,5	67,3	67,4	67,2	72,5	67,6
CD14CD206	84,4	83,1	84,8	81,9	83,8	60,1	58,7	62,6	64,2	62,1	58,3
CD14CD64	83,7	82,7	83,1	82,9	84,6	73,3	77,1	78,9	77,8	78,8	74,7
CD163CD206	43,8	49,1	45,4	43,1	43,8	24,5	43,4	44,2	42,1	52,7	41,7
CD16	16,7	14,1	14,2	11	13,1	8,08	1,01	1,29	3,42	0,54	1,98
CD4CD69	34,6	35	39,2	32,9	36,4	9,15	37,8	38,6	28,6	42,8	38
CD4CD103	36,3	35,3	40,4	34,6	35,9	10,9	35,9	36,7	26,8	37,6	33,8
CD4CD134	30,9	29,8	32,5	29,3	30,9	37,4	4,03	8,07	11,3	12,1	9,8
CD25CD127low	1,8	1,5	1,34	1,43	1,06	5,15	0,32	0,15	2,1	0,23	0,82
CD4CCR7	88,9	87,7	89,4	87,8	90,6	75,1	82,2	79,4	80,3	86,3	81
CD4CCR7neg	10,1	11,4	9,79	10,9	8,55	23,3	16,2	19,2	17,8	12,6	17,4
CD14	18,6	21,8	17,2	31,6	29,7	38,8	47,6	43,5	47,9	32,5	36,5
CD14CD64	91,5	88,2	93,1	85,6	87,6	72,3	76,3	78,5	74,2	78,6	74
CD15CD206	1,1	1,21	1,42	1,8,9	17	36,4	20,4	29	22,8	13,9	9,24
CD4CD252	41,6	47,6	47,1	38	51,6	9,49	31,5	33,7	26,4	52,2	49
CD19	65,9	63	67,3	63,1	64,5	36,7	49,1	49,7	49,1	55,3	53,7
CD19CD38	23,7	17,6	20	10,9	14,4	15,4	4,88	5,04	7,07	6,29	7,86
CD19CD38CD252	54,9	61,6	58,7	56,2	62,8	43,5	78,6	70,7	63,3	72,7	74,4
CD19CD252	56,3	56,5	57,3	54,5	58,3	50,2	58,8	56,4	56,2	60,1	62,2
Luminex											
MCP3	84	381,5	84	178	59	5088,5	353	1056	421	667	817
TSLP	232	120	135,5	131	68	135	158	108,5	1111	180	98,5
IL-4	80,5	52	102	51,5	107,5	44,5	58	80	114	23	23
IL12p70	21	12	11	13	11	15	11	11	13	10,5	11,5
IL17A	37	18	12	14	9,5	13,5	13	14	11	10	13

Maus	1			2			3			4 Maus			19			20			21			22			23			24					
Datum Rekonstitution	keine			keine			keine			keine Datum Rekonstitution			29.07.20			29.07.20			29.07.20			29.07.20			29.07.20			29.07.20					
Donor	AD 10			AD 10			AD 10			AD 10 Donor			AD 14			AD 14			AD 14			AD 14			AD 14			AD 14					
Behandlung	Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO			Behandlung			Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO			Sensitivierung DMSO					
Klinischer Score	0			2			0			0			Klinischer Score			1			2			0			0			0			0		
Histo Score	1			1			1			0			Histo Score			5			3			5			6			7			8		
Haut Score	0			2			0			0			Haut Score			3			2			1			1			2			1		
FACS													FACS																				
hCD45													hCD45			1,48			1,28			3,48			2,44			1,41			1,74		
mCD45													mCD45			19,8			22,9			26,6			29,3			28,4			37,3		
CD27neg													CD27neg			27,5			22,9			21,6			22,6			23,4			23		
CD27negIgDneg													CD27negIgDneg			22,5			17,7			15			15,4			19,3			18		
CD27negIgDpos													CD27negIgDpos			74,1			79,2			80,8			79,1			73,8			78,8		
CD27pos													CD27pos			71,1			75,8			77,1			75,8			74,9			75,8		
CD27posIgDneg													CD27posIgDneg			39			38,5			37,5			29,3			27,4			27,7		
CD27posIgDpos													CD27posIgDpos			60,2			60,8			61			68,3			66			70,4		
CD4													CD4			13,6			8,48			13,6			18,6			11,7			11,3		
CD4CD45RA													CD4CD45RA			0,6			0,49			0,49			0,68			0,21			0,31		
CD4CD45RACD62neg CCR7+													CD4CD45RACD62neg CCR7+			0			0			0			0			0			0		
naive CD4													naive CD4			100			100			72,7			95,5			100			100		
CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells													CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells			0			0			0			4,55			0			0		
CD4CD45RO													CD4CD45RO			0,3			6,92			39,6			26,6			7,49			27,1		
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory													CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory			0			7,14			6,05			8,04			8,99			6,92		
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory													CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory			100			58			49,9			50,7			36			49,8		
CD8													CD8			0			27,7			33,2			27,3			27,3			27,4		
CD14													CD14			4,56			0,031			0,24			0,1			0,054			0,03		
CD14CD1a													CD14CD1a			72			73,8			71,9			66,5			70,3			67,4		
CD14CD252													CD14CD252			30,3			29,5			47,6			52,3			30,5			46		
CD14TSLPR													CD14TSLPR			16,3			15,1			31,2			31,6			33,6			24,2		
CD14CD163													CD14CD163			0,98			0,93			0,81			1,01			1,33			1,06		
CD14CD206													CD14CD206			78,4			79			78,2			84,5			85,1			78,7		
CD14CD64													CD14CD64			21,6			21,9			19,1			30,3			36,5			40,8		
CD163CD206													CD163CD206			78,1			76			69,6			79,5			79			77,7		
CD16													CD16			22,2			20,5			19,9			26,6			32			30,6		
CD4CD69													CD4CD69			0,67			0,81			1,44			4,93			6,06			6,32		
CD4CD103													CD4CD103			48,2			47,2			37,6			41,4			41,3			65,9		
CD4CD134													CD4CD134			42,4			39,7			31,7			33,1			33,4			58,1		
CD25CD127low													CD25CD127low			0,55			0,54			0,39			0,78			1,18			1,86		
CD4CCR7													CD4CCR7			0			0			0			0			0			0		
CD4CCR7neg													CD4CCR7neg			38,4			40,4			37,7			31,4			37,2			37,8		
CD14													CD14			59,2			56,9			59,7			64,5			59,6			59,3		
CD14CD64													CD14CD64			37,6			37,6			53,4			52,9			58,7			50,4		
CD15CD206													CD15CD206			90,2			87			86,9			84,4			86,1			85,5		
CD4CD252													CD4CD252			30,6			29			31,9			30,5			30,1			31,5		
CD19													CD19			62,5			62,4			62,9			75,1			77,3			70,3		
CD19CD38													CD19CD38			77			74,7			74,1			70,4			75,4			72,7		
CD19CD38CD252													CD19CD38CD252			22			26,3			24,9			25,5			26			28		
CD19CD252													CD19CD252			77,6			80,2			75,6			81,6			79,9			72,5		
													Luminex			75,1			79,1			70,4			74,3			72,7			67,1		
													MCP3			209			139,5			1816			560			222			179		
													TSLP			53			59,5			360,5			197,5			234			299		
													IL-4			21			19			23			20			20			27		
													IL12p70			26			25			26			20			22			26		
													IL17A			18			17			18			14			16			18		

Maus	1	2	3	4 Maus	19	20	21	22	23	24
Datum Rekonstitution	keine	keine	keine	keine Datum Rekonstitution	29.07.20	29.07.20	29.07.20	29.07.20	29.07.20	29.07.20
Donor	AD 10	AD 10	AD 10	AD 10 Donor	AD 14	AD 14	AD 14	AD 14	AD 14	AD 14
Behandlung	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Behandlung	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO	Sensitivierung DMSO
Klinischer Score	0	2	0	0 Klinischer Score	1	2	0	0	0	0
Histo Score	1	1	1	1 Histo Score	5	3	5	6	7	8
Haut Score	0	2	0	0 Haut Score	3	2	1	1	2	1
FACS				FACS						
hCD45				hCD45	1,48	1,28	3,48	2,44	1,41	1,74
mCD45				mCD45	19,8	22,9	26,6	29,3	28,4	37,3
CD27neg				CD27neg	27,5	22,9	21,6	22,6	23,4	23
CD27negIgDneg				CD27negIgDneg	22,5	17,7	15	15,4	19,3	18
CD27negIgDpos				CD27negIgDpos	74,1	79,2	80,8	79,1	73,8	78,8
CD27pos				CD27pos	71,1	75,8	77,1	75,8	74,9	75,8
CD27posIgDneg				CD27posIgDneg	39	38,5	37,5	29,3	27,4	27,7
CD27posIgDpos				CD27posIgDpos	60,2	60,8	61	68,3	66	70,4
CD4				CD4	13,6	8,48	13,6	18,6	11,7	11,3
CD4CD45RA				CD4CD45RA	0,6	0,49	0,49	0,68	0,21	0,31
CD4CD45RACD62neg CCR7+				CD4CD45RACD62neg CCR7+	0	0	0	0	0	0
naive CD4				naive CD4	100	100	72,7	95,5	100	100
CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells				CD4CD45RACD62LposCCR7neg effector cells	0	0	27,3	4,55	0	0
CD4CD45RO				CD4CD45RO	0,3	6,92	39,6	26,6	7,49	27,1
CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory				CD4CD45ROCD62LnegCCR7pos central memory	0	7,14	6,05	8,04	8,99	6,92
CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory				CD4CD45ROCD62LposCCR7neg effector memory	100	58	49,9	50,7	36	49,8
CD8				CD8	0	27,7	33,2	27,3	27	27,4
CD14				CD14	0	7,14	10,9	14	28,1	15,9
CD14CD1a				CD14CD1a	4,56	0,031	0,24	0,1	0,054	0,03
CD14CD252				CD14	72	73,8	71,9	66,5	70,3	67,4
CD14TSLPR				CD14CD1a	30,3	29,5	47,6	52,3	30,5	46
CD14CD163				CD14CD252	16,3	15,1	31,2	31,6	33,6	24,2
CD14CD206				CD14TSLPR	0,98	0,93	0,81	1,01	1,33	1,06
CD14CD64				CD14CD163	78,4	79	78,2	84,5	85,1	78,7
CD163CD206				CD14CD206	21,6	21,9	19,1	30,3	36,5	40,8
CD16				CD14CD64	78,1	76	69,6	79,5	79	77,7
CD4CD69				CD163CD206	22,2	20,5	19,9	26,6	32	30,6
CD4CD103				CD16	0,67	0,81	1,44	4,93	6,06	6,32
CD4CD134				CD4CD69	48,2	47,2	37,6	41,4	41,3	65,9
CD25CD127low				CD4CD103	42,4	39,7	31,7	33,1	33,4	58,1
CD4CCR7				CD4CD134	0,55	0,54	0,39	0,78	1,18	1,86
CD4CCR7neg				CD25CD127low	0	0	0	0	0	0
CD14				CD4CCR7	38,4	40,4	37,7	31,4	37,2	37,8
CD14CD64				CD4CCR7neg	59,2	56,9	59,7	64,5	59,6	59,3
CD15CD206				CD14	37,6	37,6	53,4	52,9	58,7	50,4
CD4CD252				CD14CD64	90,2	87	86,9	84,4	86,1	85,5
CD19				CD15CD206	30,6	29	31,9	30,5	30,1	31,5
CD19CD38				CD4CD252	62,5	62,4	62,9	75,1	77,3	70,3
CD19CD38CD252				CD19	77	74,7	74,1	70,4	75,4	72,7
CD19CD252				CD19CD38	22	26,3	24,9	25,5	26	28
				CD19CD38CD252	77,6	80,2	75,6	81,6	79,9	72,5
				CD19CD252	75,1	79,1	70,4	74,3	72,7	67,1
				Luminex						
				MCP3	209	139,5	181,6	560	222	179
				TSLP	53	59,5	360,5	197,5	234	299
				IL-4	21	19	23	20	20	27
				IL12p70	26	25	26	20	22	26
				IL17A	18	17	18	14	16	18

10.7 R-Skripte

Deskriptive Statistik:

```
describeBy(Scores_ADall$hCD45, Scores_ADall$Behandlung)
```

Shapiro-Test auf Normalverteilung:

```
shapiro.test(DMSO$Histoscore)
```

Histogramm zum Test auf Normalverteilung:

```
hist(DMSO$Histoscore)
```

Levene-Test:

```
leveneTest(CD19~Behandlung, Scores_ADall)
```

Mann-Whitney-U-Test:

```
wilcox.test(Histoscore~Behandlung, data = Scores_ADall, exact=FALSE, correct= FALSE,  
conf.int=TRUE)
```

Kruskal-Wallis Test mit paarweisem Wilcoxon-Test und Bonferroni α -Fehler-Korrektur:

```
kruskal.test(Scores_ADall$CD14CD64~Scores_ADall$Behandlung)
```

```
pairwise.wilcox.test(Scores_ADall$CD14CD64,Scores_ADall$Behandlung,
```

```
paired = FALSE,
```

```
p.adjust = "bonferroni"
```

```
)
```

Plot:

```
Scores_ADall <- read_excel("~/Dateipfad.xlsx", sheet=no.)
```

```
plot(Scores_ADall$TH1,
```

```
  #type = "h",
```

```
  col = "orange",
```

```
  pch = 17, cex = 1.5,
```

```
  main = "Th1- und Th2-Zellen", cex.main = 0.7,
```

```
  ylab = "Th1- und Th2-Zellen", cex.lab = 0.7, cex.axis = 0.7,
```

```
  xlab = "Patient",
```

```
  xaxt = "n", yaxt = "n",
```

```
  ylim = c(0, 100)
```

```
.....)
```

```
par(new = TRUE)
```

```
plot(Scores_ADall$TH2,
```

```
  #type = "l",
```

```
  pch = 17, cex = 1.5,
```

```
  col = "red",
```

```
  xaxt = "n", yaxt = "n",
```

```
  ylim = c(0, 100),
```

```
  ylab = "", xlab = ""
```

```
.....)
```

```
axis(1, at=seq(1, 21, by=1),
```

```
  cex.axis = 0.7,
```

```
  labels = c(1,3,5:9,11:24)
```

```

.....)

axis(2, at=seq(0, 100, by=20),

      cex.axis = 0.7

.....)

abline(h = seq(0, 100, by=10), v = 1:21, col = "lightgray", lty = "dotted")

legend("topleft", c("Th1", "Th2"),

      col = c("orange", "red"),

      pch = 17, cex = 0.7

.....)

```

Histogramm:

```

Scores_ADall <- read_excel("~/Dateipfad.xlsx ", sheet= no.)

par(oma=c(0,0,1,1))

par(mar=c(5,5,2,2))

hist(Scores_ADall$hCD45, main = "hCD45", ylab = "Anzahl der Tiere", xlab = "hCD45 [%
Gesamtleukozytenzahl]")

```

Gardner-Altman-Plot:

```

Scores_ADI_3_5_9_14 <- read_excel("~/Dateipfad.xlsx ", sheet= no.)

Scores <- tibble(Scores_ADI_3_5_9_14)

two.group.unpaired <- dabest(Scores, Behandlung, IL12p70,

      idx = c("Kontrolle",

              "Prednisolon"),

      paired=FALSE)

two.group.unpaired.meandiff <- mean_diff(two.group.unpaired)

```

```
plot(two.group.unpaired.meandiff, rawplot.type = "swarmplot", rawplot.markersize = 1,
rawplot.ylabel = "IL-12p70 [pg/ml]", palette = "Dark2")
```

Cumming-estimation-Plot:

```
Scores_AD1_3_5_9_14 <- read_excel("~/Dateipfad.xlsx", sheet= no.)
```

```
Scores <- tibble(Scores_AD1_3_5_9_14)
```

```
shared.control <- dabest(Scores, Behandlung, Hautscore,
```

```
  idx = c("B",
```

```
    "A",
```

```
    "C",
```

```
    "D",
```

```
    "E",
```

```
    "F"),
```

```
  paired=FALSE)
```

```
Scores.mean_diff <- mean_diff(shared.control, ci=95)
```

```
plot(Scores.mean_diff, rawplot.type = "swarmplot", rawplot.markersize = 1, rawplot.ylabel =
"Hautscore", palette = "Dark2")
```

Hierarchische Clusterheatmap:

```
FACS_PBMC <- read_excel("~/Dateipfad.xlsx", na= "NA", sheet= no., col_names = TRUE,
.name_repair = "minimal")
```

```
rnames <- FACS_PBMC$Kürzel
```

```
y <- t(data.matrix(FACS_PBMC[,2:ncol(FACS_PBMC)]))
```

```
colnames(y) <- rnames
```

```
par(oma=c(0,8,0,8))
```

```
par(mar=c(0,0,0,0))
```

```
heatmap.2(y,  
  
  scale="column",  
  
  col= colorRampPalette(brewer.pal(8, "Blues"))(25),  
  
  #main = "Immunprofilierung",  
  
  na.color = "grey",  
  
  tracecol = NA,  
  
  trace = "none",  
  
  key = TRUE,  
  
  key.title = "Color Key and Histogram",  
  
  lwid = c(1.5,4),  
  
  lhei = c(1.5,4,1.4),  
  
  cexCol = 0.7,  
  
  cexRow = 0.5,  
  
  sepwidth = c(0.01, 0.01),  
  
  dendrogram = "column",  
  
  lwid = c(1, 15),  
  
  lhei = c(1, 15)  
  
)
```

oPLS-DA:

```
BC <- 5
```

```
sheets <- c(BC)
```

```
data <- read_excel("~/Dateipfad.xlsx", sheet = no.)
```

```
groups <- data.frame(select(data, 1))
```

```
behandlungFC <- groups[, "Behandlung"]  
  
dataMatrix <- data.matrix(data[,3:ncol(data)])  
  
pca <- opls(dataMatrix, fig.pdfC = "none")  
  
plot(pca, par.AsColFcVn = behandlungFC)  
  
oplsda <- opls(dataMatrix, behandlungFC, predI = 1, orthoI = NA)
```

10.8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Hauptsymptome der AD</i>	8
<i>Abbildung 2: Vereinfacht dargestellte Stufentherapie zur Behandlung der AD nach Akdis et al. (2006)</i>	13
<i>Abbildung 3: Pathogenese der atopischen Dermatitis, adaptiert nach Leung et al. (2004a)</i>	19
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs (in Tagen)</i>	28
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs inklusive der Medikamentengaben (in Tagen)</i>	29
<i>Abbildung 6: Beispiele zur Evaluierung des makroskopischen Hautscores</i>	33
<i>Abbildung 7: Beispiele zur Evaluierung des histologischen Scores; HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, links: Score 6, rechts: Score 7</i>	40
<i>Abbildung 8: Hierarchische Clusterheatmap zur Darstellung der Immunprofilierungen aller an AD erkrankten Patientinnen und Patienten</i>	50
<i>Abbildung 9: Verteilung der Th1 [%CD4⁺CXCR3⁺]- und Th2[%CD4⁺CCR4⁺]-Zellen bei den einzelnen Spenderinnen und Spendern</i>	51
<i>Abbildung 10: Histogramm zur Darstellung des Rekonstitutionsgrades</i>	52
<i>Abbildung 11: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung des klinischen Scores</i>	53
<i>Abbildung 12: Vergleich des makroskopischen Hautscores</i>	54
<i>Abbildung 13: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung des makroskopischen Hautscores</i>	55
<i>Abbildung 14: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, linkes Bild A = keine Rekonstitution, Sensitivierung mit DMSO, Score 0; rechtes Bild E = Kontrolle, keine Sensitivierung, atopischer Spender/ Spenderin, Score 0</i>	56
<i>Abbildung 15: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, linkes Bild: B = nicht-atopische Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Score 3, rechtes Bild: D = nicht-atopische Spenderin, keine Sensitivierung, Score 2</i>	56
<i>Abbildung 16: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung C = atopischer Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Score 7</i>	57
<i>Abbildung 17: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung des histologischen Scores</i>	58
<i>Abbildung 18: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung der Leukozyten und Monozyten in der Milz</i>	59
<i>Abbildung 19: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung der CD4-T-Zellaktivierung in der Milz</i>	61

<i>Abbildung 20: Cumming-Estimation-Plot zur Darstellung von MCP-3 und TSLP in der Haut.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 21: Cumming-estimation-Plot zur Darstellung von IL-4, IL-12p70 und IL-17A in der Haut</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 22: Gardner-Altman-Plot zur Darstellung des klinischen Scores: Vergleich der Kontrollgruppe und der mit Prednisolon behandelten Gruppe</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 23: links: makroskopischer Hautscore, Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon, Score 0; rechts: Gardner-Altman-Plot zur Darstellung des Hautscores: Vergleich der Kontrollgruppe und der mit Prednisolon behandelten Gruppe.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 24: links: Haut, HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg, Score 4, rechts: Gardner-Altman-Plot zur Darstellung des histologischen Scores: Vergleich der Kontrollgruppe und der mit Prednisolon behandelten Gruppe</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 25: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung der Leukozyten und Monozyten in der Milz</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 26: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung der CD4-T-Zellaktivierung in der Milz.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 27: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung der B-Zellen in der Milz.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 28: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung von MCP-3 und TSLP in der Haut.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 29: Gardner-Altman-Plots zur Darstellung von IL-4, IL-12p70 und IL-17A in der Haut.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 30: oPLS-DA, blau = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO; rot = Rekonstitution mit atopischem Spender/ Spenderin, Sensitivierung mit DMSO, Behandlung mit Prednisolon 1 mg/kg; links oben: Inertia Barplot: eine orthogonale Komponente scheint zur Beschreibung ausreichend; rechts oben: Signifikanzdiagnostik: pR^2Y und pQ^2Y des Modells verglichen mit den erzielten Y-Werten aus der random permutation; links unten: Extremwertdiagnostik; rechts unten: Score-Plot: $R^2X = 0,299$; $R^2Y = 0,797$; $Q^2Y = 0,690$; $t1 = 14\%$, $RMSEE = 0,221$</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 31: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in den PBMC, Teil 1</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 32: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in den PBMC, Teil 2</i>	<i>107</i>

<i>Abbildung 33: Gating zur Differenzierung der T-Zellaktivierung in den PBMC</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 34: Gating zur Differenzierung der T-Helferzellen in den PBMC</i>	<i>109</i>
<i>Abbildung 35: Gating zur Differenzierung der Monozyten in den PBMC, Teil 1</i>	<i>109</i>
<i>Abbildung 36: Gating zu Differenzierung der Monozyten in den PBMC, Teil 2</i>	<i>110</i>
<i>Abbildung 37: Gating zur Differenzierung der Monozyten in den PBMC, Teil 3</i>	<i>110</i>
<i>Abbildung 38: Gating zur Differenzierung der dendritischen Zellen in den PBMC</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 39: Gating zur Differenzierung der B-Zellen in den PBMC</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 40: Gating zur Differenzierung von hCD45 und mCD45 in der Milz</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 41: Gating zur Differenzierung der B-Zellen in der Milz.....</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 42: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in der Milz, Teil 1.....</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 43: Gating zur Differenzierung der T-Zellen in der Milz, Teil 2.....</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 44: Gating zur Differenzierung der Monozyten in der Milz, Teil 1.....</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 45: Gating zur Differenzierung der Monozyten in der Milz, Teil 2.....</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 46: Gating zur Differenzierung der T-Zell-Aktivierung in der Milz.....</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 47: Gating zur Differenzierung von T-Zellen bzw. B-Zellen und CD252 in der Milz.....</i>	<i>115</i>

10.9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Darstellung der Tierzahlen pro Gruppe; in Klammern Angabe der vor Versuchsende getöteten bzw. verendeten Tiere.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Kriterien, Ausprägung und Bewertung zur Erstellung eines klinischen Scores</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Kriterien, Ausprägung und Bewertung zur Erstellung eines makroskopischen Hautscores.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>FACS-Antikörper.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 5:</i>	<i>Definition von B-Zell Subtypen anhand ihrer Oberflächenmarker.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 6:</i>	<i>Definition von T-Zell Subtypen anhand ihrer Oberflächenmarker.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 7:</i>	<i>Kriterien, Ausprägung und Bewertung zur Erstellung eines histologischen Scores</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 8:</i>	<i>Übersicht über die Spenderpatientinnen und den Spenderpatienten für die Tierversuche.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 9:</i>	<i>Übersicht über die Spenderpatientinnen und Spenderpatienten für die Immunprofilierungen.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 10:</i>	<i>Zusammenfassung der grundlegenden demografischen Daten aller Spenderinnen und Spender.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 11:</i>	<i>Liste der verwendeten FACS Antikörper.....</i>	<i>116</i>
<i>Tabelle 12:</i>	<i>Liste der verwendeten Marker zur Bestimmung der Immunzellen.....</i>	<i>118</i>

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolf und meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Siebeck für die Möglichkeit einer Promotion danken.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Groppe für die herausragende Betreuung bedanken; besonders für die Übertragung der großen Verantwortung, für wissenschaftliche Hilfestellungen, schnelles Korrekturlesen, konstruktive Gespräche und ständige Erreichbarkeit.

Danke auch an die vielen Patientinnen und Patienten, die bereit waren, für meine Forschungen Blut zu spenden und mir von ihrer Krankheitsgeschichte zu erzählen.

Vielen Dank an Henrika für die kompetente Einarbeitung und auch noch späteres Beantworten jeglicher auftretenden Fragen. Danke auch an meine Kolleginnen Paula und Anna für die Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten und besonders an Alena, die viele lange Tage mit mir in der Tierhaltung verbrachte und mich auch in anstrengenden Zeiten stets motivierte.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten Team der ZVH für die großartige geleistete Arbeit gerade auch in Zeiten der Pandemie bedanken. Besonderer Dank geht an Frau Dr. Dobler für das entgegengebrachte Vertrauen und die tolle Unterstützung bei fachlichen Fragen.

Des Weiteren vielen Dank an meine Mama, meine Schwester und Maik für die schnelle und kritische Durchsicht meiner Arbeit, was in einem fachfremden Bereich sicher nicht immer einfach ist, sowie an Basti für die Einführung in die höhere Mathematik und Nico für das Proofreading der Summary.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Mama bedanken, die mich immer bedingungslos unterstützt. Ohne sie wäre Vieles nicht möglich gewesen.

Ganz besonders möchte ich noch Maik danken, dessen Unterstützung mir sehr viel Kraft und Rückhalt gegeben hat, und der Tag und Nacht bei anfallenden Problemen Rat wusste. Danke, dass du immer an meiner Seite bist!