

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**BEEINFLUSSUNG DES WACHSTUMS VON  
DERMATOPHYTEN  
DURCH STOFFE DER NATÜRLICHEN IMMUNABWEHR**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**PETER FRITZ**  
aus Landsberg am Lech

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Brasch, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Podschun, Institut für Infektionsmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.11.2012

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi, Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Pilze	5
1.2	Dermatophyten	5
1.3	Dermatophytosen	5
1.4	Antimikrobielle Peptide	6
1.5	humanes $\beta$ -Defensin-2	6
1.6	Ribonuklease 7	7
1.7	Psoriasis	8
1.8	Fragestellungen	9
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Versuchskonzept	10
2.2	Dermatophyten	10
2.3	Nährböden zur Anzucht der Dermatophyten	11
2.4	Herstellung des 10 Millimolaren Natrium-Phosphat-Puffers	12
2.5	Gewinnung der Konidien	12
2.6	Herstellung der Sabouraud-Bouillon	13
2.7	Vorkeimung der Konidien	13
2.8	Versuchsaufbau	15
2.9	Statistische Methoden	16
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>17</b>
3.1	Vorversuche	17
3.2	Hauptversuche	18
3.3	statistische Analysen	38
<b>4.</b>	<b>Besprechung der Ergebnisse (Diskussion)</b>	<b>44</b>
4.1	humanes $\beta$ -Defensin-2	44
4.2	Ribonuklease 7	47
4.3	Psoriasis	48
4.4	Antimikrobielle Peptide	50
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	51

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>70</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Pilze

Pilze gehören zu den Eukaryonten, das heißt sie besitzen Zellkern, Zellmembran und mehrere Chromosomen. In der derzeit aktuellen Systematik der Eukaryonten befinden sie sich in der Gruppe der Opisthokonta. Sie besitzen kein Chlorophyll und nehmen ihre Nahrung über Absorption auf. Pilze unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Struktur, Ernährung, Wachstum und Vermehrung von anderen Eukaryonten, so dass sie ein eigenständiges Reich bilden, zu dem Hefen, Schimmelpilze und Dermatophyten gehören (Carlile und Watkinson 1996).

## 1.2 Dermatophyten

Dermatophyten sind Fadenpilze, die aus Hyphen in Form von länglichen Zellstrukturen bestehen. Diese wiederum enthalten chitinhaltige Zellwände, Membranen und alle für Eukaryonten typischen Organellen. Das Wachstum findet an den Hyphenspitzen statt. Ein daraus resultierendes Geflecht aus Hyphen wird Mycel genannt. Die Vermehrung erfolgt asexuell über Sporen, die meist in Ketten oder Konglomeraten an den Hyphen gebildet werden. Diese Sporen nennt man Konidien, die nach ihrer Größe in Mikro- und Makrokonidien unterschieden werden. Dermatophyten können unterschiedliche Substrate wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Keratin utilisieren. Letzteres kann von den Dermatophyten mit Hilfe der Keratinase zersetzt werden.

Man unterteilt die Dermatophyten in die Gattungen *Microsporum* (*M.*), *Trichophyton* (*T.*) und *Epidermophyton* (*E.*). In der Taxonomie der Dermatophyten ergeben sich derzeit aufgrund genetischer Untersuchungen einige Änderungen. Man kennt circa 40 verschiedene Arten von beim Menschen und bei Tieren pathogenen Dermatophyten (Carlile und Watkinson 1996).

## 1.3 Dermatophytosen

Dermatophyten verursachen als Infektionserreger beim Menschen Entzündungen der Haut, der Haare und der Nägel. Eine solche Infektion nennt man Dermatophytose oder Tinea (Weitzman and Summerbell 1995, Weitzman and Padhye 1996, Brasch 2009). Fügt man die betroffene anatomische Struktur hinzu, erhält man den vollständigen Krankheitsnamen, z.B.

Tinea capitis. Dermatophyosen spielen sich meist nur im Stratum corneum und Stratum granulosum, also den oberflächlichen Hautschichten, ab und verursachen nur selten tiefe oder systemische Mykosen nach Durchdringung der Basalmembran (Martin et al. 1993).

Dermatophyosen werden mit Antimykotika behandelt. Da es jedoch nach wie vor Fälle gibt, bei denen diese Medikamente keine befriedigende Wirkung erreichen, ist die Suche nach neuen Wirkstoffen von großer klinischer Bedeutung.

## **1.4 Antimikrobielle Peptide**

Da tiefe Dermatophyosen sehr selten sind, liegt der Schluss nahe, dass der Körper über effektive Verteidigungsmittel verfügt. Patienten mit durchbrochener physikalischer Hautbarriere, wie z.B. bei Psoriasis, einer nicht erregerbedingten entzündlichen Hautkrankheit, erleiden wenige Hautinfektionen. Daher wird angenommen, dass es in der Epidermis ein wirksames Abwehrsystem gibt. Ein Bestandteil davon sind die antimikrobiellen Peptide (AMPs), die als körpereigene Antibiotika fungieren können (Brasch 2009, Harder et al. 1997, Harder et al. 2001, Gläser 2011). Dieses System zur Erregerabwehr ist ein zentraler Schutz des Lebens. Es gibt keinen bekannten eukaryontischen Organismus, der ohne AMPs, wie z.B. Defensine, überlebt. Diesen Molekülen konnte bereits eine Wirkung auf gramnegative und grampositive Bakterien, Viren, verschiedene Protozoen und Pilze nachgewiesen werden (Wehkamp et al. 2007).

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten AMPs erläutert.

## **1.5 humanes $\beta$ -Defensin-2**

Die Epidermis der menschlichen Haut umfasst mehrere Schichten aus Keratinozyten in unterschiedlich differenzierten Stadien. Stratum corneum und Stratum granulosum bestehen aus Korneozyten bzw. differenzierten Keratinozyten, die in die oberflächliche Formation der physikalischen Barriere eingebaut sind (Schröder und Harder 2006, Norlen 2003) und so genannte Lamellenkörper mit lipidreichem sekretorischem Granulat enthalten. Die Immunreaktivität von humanem  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) ist in den oberflächlichsten Schichten der Epidermis und des Stratum corneum lokalisiert. Subzellulär wird hBD-2 in den Lamellenkörpern von stimulierten Keratinozyten des Stratum spinosum der Epidermis gespeichert, was darauf hinweist, dass hBD-2 mit dem lipidartigen Inhalt von Lamellarkörpern freigesetzt wird (Schröder und Harder 2006, Oren et al. 2003). Mittels

spezifischer Antikörper und Immunfärbung konnte beobachtet werden, dass das Muster der Peptidlokalisation eher fokal ist (Schröder und Harder 2006, Ali et al. 2001), ähnlich dem Färbemuster von Psoriasin (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005), was darauf hinweist, dass hBD-2 lokal induziert wird. In Epithelzellen des Mundes wurde hBD-2 nur in differenzierenden Zellen durch Anregung mit entzündungsauslösenden Zytokinen oder Bakterienprodukten nachgewiesen (Schröder und Harder 2006, Dale und Krisanaprakornkit 2001). Dagegen lassen sich AMPs in hoher Konzentration in Extrakten läsionaler Schuppen von Patienten mit Psoriasis, einer nicht durch Erreger hervorgerufenen inflammatorischen Dermatose, nachweisen. Dieser Befund kann zum Teil die Beobachtung erklären, dass Patienten mit Psoriasis selten an Hautinfektionen leiden. Aus den psoriatischen Schuppenextrakten ist das erste humane induzierbare AMP hBD-2 isoliert und kloniert worden (Harder et al. 1997, Harder et al. 2001). Die Menge an hBD-2 beträgt geschätzt 10–50 µg/g Psoriasis-Schuppen, was auf eine Konzentration von 2–10 µM in der Haut schließen lässt (Harder und Schröder 2005). hBD-2 ist kationisch, und obwohl die Form und die Ladungsverteilung ähnlich zu anderen Defensinen ist, wurde mit Hilfe von Röntgenanalysen eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix-Region nachgewiesen, die bei anderen Defensinen nicht vorkommt. Die Molekülmasse beträgt 4328 Dalton. hBD-2 tötet gramnegative Bakterien wie *Escherichia (E.) coli* und *Pseudomonas (P.) aeruginosa* effektiv ab. Es lässt sich in gesunder Haut kaum nachweisen, wohingegen entzündliche Vorgänge oder der Kontakt mit bestimmten Bakterien die Defensin-Produktion induzieren (Harder et al. 2001).

## 1.6 Ribonuklease 7

Auch die gesunde Haut des Menschen produziert gegen verschiedene Erreger gerichtete AMPs. Untersuchungen von Stratum corneum-Extrakten hautgesunder Probanden auf antimikrobiell aktive Moleküle führten zur Entdeckung der Ribonuklease 7 (RNase 7). Dieses AMP wirkt gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen und hat eine absolute Molekülmasse von circa 14500 Dalton (Harder und Schröder 2002). Elektrosprayionisationsmassenspektrometrieanalysen (ESI-MS) offenbaren die Anwesenheit von vier Disulfid-Brücken (Harder und Schröder 2002). Es ist eines der Hauptproteine für die Heparinbindung in von gesunder Haut stammenden Stratum corneum-Extrakten. Es ist möglich, 4-8 µg/g Stratum corneum zu isolieren (Harder und Schröder 2002). Im Gegensatz dazu können von Psoriasissschuppen 10-25 µg/g gewonnen werden (Harder und Schröder 2005). RNase 7 scheint also ebenso induzierbar zu sein wie hBD-2. Natürliche aus der Haut

gewonnene RNase 7 besitzt eine Aktivität gegen ein breites mikrobielles Spektrum, und zwar sowohl gegen gramnegative Bakterien (*E. coli* und *P. aeruginosa*), als auch grampositive Bakterien (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus (S.) aureus*). Es ist von besonderem Interesse, dass aus unbekanntem Gründen RNase 7 bereits bei einer Konzentration von 20 nM einen vancomycinresistenten Stamm von *Enterococcus faecium* äußerst wirksam abtötet (Harder und Schröder 2002, Harder et al. 2002). RNase 7 ist eines der stärksten und wirksamsten heute bekannten menschlichen AMPs. Durch die relativ hohe Menge an RNase 7 in der Haut, die Induzierbarkeit durch den Kontakt mit Bakterien und seine Fähigkeit, grampositive *Enterococce*n abzutöten, kann dieses AMP eine Hauptrolle beim Verhindern von Hautinfektionen durch grampositive Darmbakterien spielen.

## 1.7 Psoriasin

Ein weiteres aus gesunder Haut stammendes AMP ist ein in relativ großen Mengen vorhandenes antimikrobielles Protein, das mit dem S-100-Protein Psoriasin identisch ist (Gläser et al. 2005). Biochemische Analysen der *E. coli*-Tötungsaktivität in Extrakten aus Stratum corneum gesunder Personen identifizierten Psoriasin (S100A7) als einen Hauptvertreter der *E. coli*-tötenden AMPs (Gläser et al. 2005). Die Molekülmasse von Psoriasin beträgt 11366 Dalton. Analysen der Waschflüssigkeit gesunder Personen zeigen ebenfalls Psoriasin als Hauptbestandteil der darin enthaltenen Proteine, was vermuten lässt, dass es zur Körperoberfläche abgegeben wird (Gläser et al. 2005). In der Haut wird Psoriasin herdförmig exprimiert und von Keratinozyten freigesetzt, was besonders in Hautarealen mit viel Bakterienkolonisation gut dokumentiert wurde, wie zum Beispiel in den obersten Schichten von Haarbälgen oder Nasenhaut. Andererseits zeigen trockene Gebiete der Haut, wie untere Beinhaut, deutlich weniger Psoriasinexpression. Interessant ist ebenso, dass außer Keratinozyten auch Sebozyten, die lipid-absondernden Zellen der Talgdrüsen, reaktionsfähiges Psoriasin enthalten, was darauf hinweist, dass Psoriasin vielleicht zusammen mit Lipiden sezerniert wird. Wenn gesunde Haut zuerst mit Puffer und dann mit Azeton gewaschen wird, um Hautlipide zu extrahieren, kann Psoriasin sowohl von den wässrigen als auch von den Azetonextrakten wieder gewonnen werden (Gläser et al. 2005). Diese Daten zeigen, dass das stark hydrophobe Psoriasin auch in der Lipidschicht gesunder Haut gespeichert wird.

## 1.8 Fragestellungen

Aufgrund dieser Daten kann man davon ausgehen, dass AMPs als Teil der natürlichen Immunabwehr gegen Bakterien in menschlicher Haut exprimiert werden (Gläser 2011, Gläser et al. 2005, Harder et al. 1997, Harder et al. 2001, Harder und Schröder 2002). Jedoch ist momentan nur wenig bekannt über mögliche antifungale Effekte der AMPs. Erst kürzlich zeigten neue Ergebnisse, dass hBD-2 eine schwache Aktivität gegen *T. rubrum* haben kann (Jensen et al. 2007) und dass einige Defensine in von Dermatophyten infizierter Epidermis exprimiert werden (Brasch 2010). Tinea ist weltweit die häufigste Form der Pilzinfektionen der Haut und es liegt nahe, über die Rolle der AMPs dabei zu spekulieren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob AMPs einen Effekt auf Dermatophyten haben, wofür *in vitro* Versuche mit hBD-2, RNase 7 und Psoriasin zusammen mit vier klinisch wichtigen Dermatophytenarten durchgeführt wurden. Es wurde getestet, ob alle verwendeten Dermatophytenarten durch die genannten AMPs gleich stark gehemmt werden, wenn vorgekeimte Konidien diesen AMPs ausgesetzt werden. Auch sollte geklärt werden, ob es bei der Wirkung eine Konzentrationsabhängigkeit gibt und ob die Wirkung nach einiger Zeit nachlässt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchskonzept

Die Dermatophyten sollten durch hBD-2, RNase 7 und Psoriasin im Wachstum beeinflusst werden. Da Dermatophytenmycelien durch Wachstum immer dichter und dadurch lichtundurchlässiger werden, fanden die Versuche in Mikrotiterplatten statt, damit die Lichtdurchlässigkeit der Mikrokulturen in den Vertiefungen der Platten ausgewertet werden konnte. Durch die photometrische Messung von Extinktionswerten konnte das Wachstum der Dermatophyten objektiv quantitativ verfolgt werden. Die Wellenlänge des verwendeten Lichtes betrug 620 nm. Zusätzlich wurden mikroskopische Kontrollen der Kulturen durchgeführt.

### 2.2 Dermatophyten

4 Dermatophytenarten aus allen 3 Gattungen wurden für diese Versuche verwendet. Von jeder Art wurden Versuche mit 3 Stämmen, isoliert von unterschiedlichen Patienten, durchgeführt, um eine statistische Auswertung möglich zu machen. Alle Stämme wurden der Mykothek der Hautklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entnommen. Die Aufbewahrung erfolgt in einer Microbank<sup>TM</sup> freezer storagebox (Alere, Neston, UK) bei -80 °C. Die verwendeten Dermatophytenstämme waren erst kurz zuvor von Tineaaläsionen unterschiedlicher Patienten isoliert worden, erfüllten alle morphologischen Kriterien der jeweiligen Spezies und wiesen auch die für sie charakteristischen physiologischen Merkmale auf (Barnett et al. 1990, De Hoog et al. 2000, Weitzman und Summerbell 1995). Anhand der Stammmummern kann zurückverfolgt werden, von welchem Patienten die Dermatophyten stammen und dieselben Stämme können für spätere Vergleiche herangezogen werden.

Folgende Dermatophyten wurden untersucht:

1. *Trichophyton (T.) rubrum*

Nr. I/127, I/129, I/130 wurden alle isoliert von Tinea pedis erwachsener Männer.

2. *T. mentagrophytes*

Nr. II/68, II/80 wurden isoliert von Tinea pedis erwachsener Männer,

II/78 wurde isoliert von Tinea pedis einer erwachsenen Frau.

3. *Microsporum (M.) canis*

Nr. III/20, III/24 wurden isoliert von *Tinea capitis* bei Kindern,  
III/25 wurde isoliert von *Tinea corporis* eines Mädchens.

4. *Epidermophyton (E.) floccosum*

Nr. IV/12, IV/13, IV/14 wurden alle isoliert von *Tinea pedis* erwachsener Männer.

*T. rubrum* ist der häufigste Verursacher von Dermatophyosen in Deutschland und bildet überwiegend kleine einzellige keulenförmige Mikrokonidien, die seitlich an den Hyphen wachsen. Dünn- und glattwandige mehrzellige Makrokonidien findet man teilweise zusätzlich.

*T. mentagrophytes* ist der zweithäufigste humanpathogene Dermatophyt und bildet ebenfalls überwiegend Mikrokonidien.

*M. canis* führt häufig bei Katzen und Hunden, aber auch bei Menschen zu Dermatophyosen und bildet viele Makrokonidien, die allerdings im Unterschied zu den Makrokonidien von *Trichophyton*arten rauwandig, dickwandiger und spindelförmig sind.

*E. floccosum* ist ein anthropophiler Dermatophyt und bildet Makrokonidien, welche keulenförmig, dünn- und glattwandig und büschelförmig angeordnet sind, sowie runde Chlamydosporen. Mikrokonidien werden von dieser Art nicht gebildet.

### **2.3 Nährböden zur Anzucht der Dermatophyten**

36 g Sabouraud 2-Agar (SAB2-D, BioMerieux, Lyon, Frankreich) und 1,5 g Hefeextrakt (Oxoid Yeast Extract, LP0021) wurden in einem sterilen Kolben mit 750 ml Aqua dest. gelöst, 15 Minuten bei 120 °C autoklaviert und im Wasserbad auf etwa 50 °C gekühlt. Anschließend wurden 40.000 i.E./l Penicillin-G-Lösung (Grünenthal, Stolberg, Deutschland) und 40 mg/l Chloramphenicol (Calbiochem, La Jolla, USA) zugegeben und die noch warme Lösung in Petri-Schalen a 20 ml abgefüllt. Mit dem Bunsenbrenner wurden Lösung und Deckel kurz abgeflammt, um Verunreinigungen vorzubeugen und Blasen zu vermeiden. Nach Verschluss und Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schalen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Auf diesen Nährböden konnten alle verwendeten Dermatophyten hervorragend gedeihen. Nach steriler Überimpfung mittels ausgeglühtem Platindraht und Lagerung im Brutschrank bei 27 °C hatten sie bereits nach 10 Tagen genug Konidien für die Versuche gebildet.

## 2.4 Herstellung des 10 millimolaren Natrium-Phosphat-Puffers

In einer sterilen Flasche wurde 1 l Aqua dest. mit 3,16 ml 1-molarem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 6,84 ml 1-molarem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt und 15 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Der pH-Wert lag zwischen 7,2 und 7,3.

Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

## 2.5 Gewinnung der Konidien

Nachdem die Dermatophyten mindestens 10 Tage auf den Sabouraud-Agarplatten gewachsen waren, konnten die Konidien gewonnen werden. Dazu wurden die Kulturplatten mit 10-millimolarem Natrium-Phosphat-Puffer (NaPP) geflutet, dann wurden die Dermatophyten mechanisch mit einem sterilen Spatel gelöst. Die Konidiensprossung wurde in verschließbare Röhrchen überführt und in ein zweites Röhrchen filtriert. Die Filtration erfolgte mit Trichtern und sterilen Mullkompressen, die dreilagig verwendet wurden. Anschließend wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur und mit 2500 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland), die Flüssigkeit wurde vom Bodensatz getrennt und verworfen. Der Bodensatz wurde mit Natrium-Phosphat-Puffer aufgefüllt und mit einem Vortex-Gerät wieder gelöst. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, wie viel Mycel bereits entfernt worden war und danach wurde entschieden, ob bei der nächsten Filtration der sterile Mull ein-, zwei- oder dreilagig verwendet wurde. Nach der zweiten Filtration wurde wieder zentrifugiert, die flüssige Phase verworfen und der Bodensatz mit NaPP aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde so lang wiederholt, bis möglichst nur noch Konidien zu sehen waren. *E. floccosum*-Suspensionen bestanden nur aus Makrokonidien, wogegen die Suspensionen der anderen Arten aus Mikro- und Makrokonidien zusammengesetzt waren (deren Prozentanteile wurden nicht bestimmt). *T. rubrum*- und *T. mentagrophytes*-Suspensionen bestanden jedoch überwiegend aus Mikrokonidien und Suspensionen von *M. canis* überwiegend aus Makrokonidien.

Die Konidiendichte wurde in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und danach wurde die Konidienkonzentration auf 100 pro Mikroliter eingestellt. Zu hohe Konzentration wurden durch Verdünnen und zu niedrige durch Zentrifugieren korrigiert.

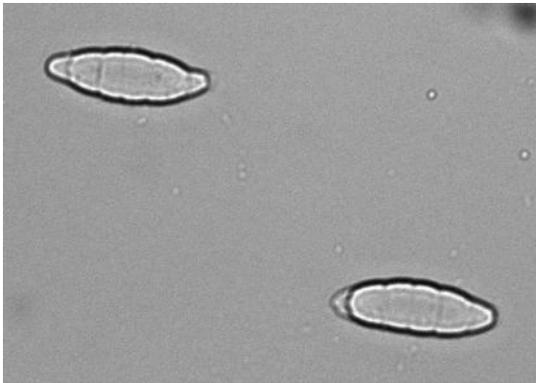
## 2.6 Herstellung der Sabouraud-Bouillon

22,5 Gramm Sabouraud milieu liquide (SAB B-D, BioMerieux, Lyon, Frankreich) wurden in einem sterilen Kolben mit 750 ml Aqua dest. vermischt und 15 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden 40.000 i.E./l Penicillin-G-Lösung und 40 mg/l Chloramphenicol zugegeben, um einer bakteriellen Verunreinigung vorzubeugen, und auch diese Lösung wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

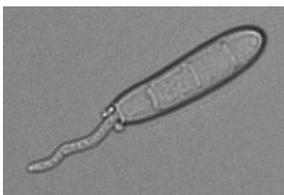
## 2.7 Vorkeimung der Konidien

5 ml der Lösung aus NaPP mit 100 Konidien pro  $\mu\text{l}$  wurden in einem Erlenmeyer-Kolben mit 25 ml Sabouraud-Bouillon vermischt. Durch Kontrolle unter dem Mikroskop wurde die Vorkeimungszeit bestimmt, also die Zeit, die die meisten Konidien benötigten um initial zu keimen bzw. auszusprossen.

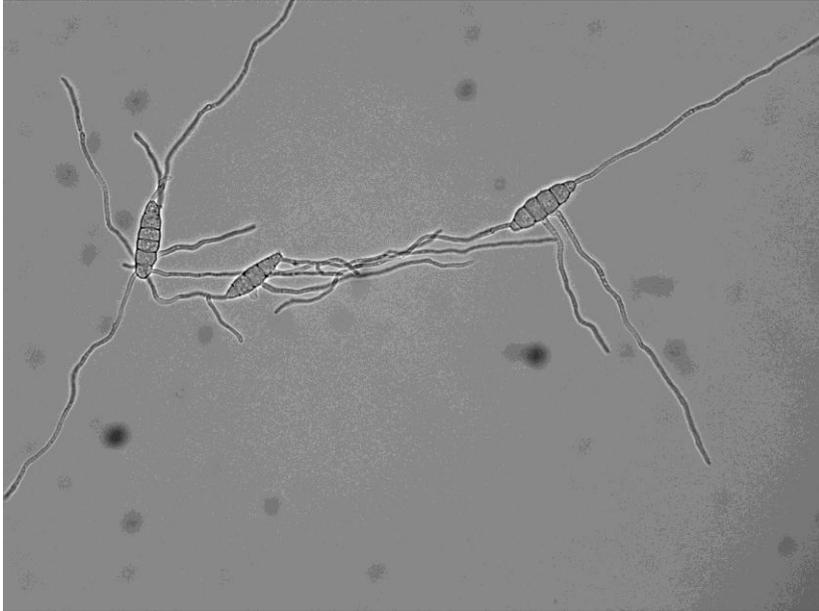
Auf folgenden Fotografien ist anhand von *T. rubrum*-Makrokonidien die Bestimmung der Vorkeimungszeit beispielhaft dargestellt:



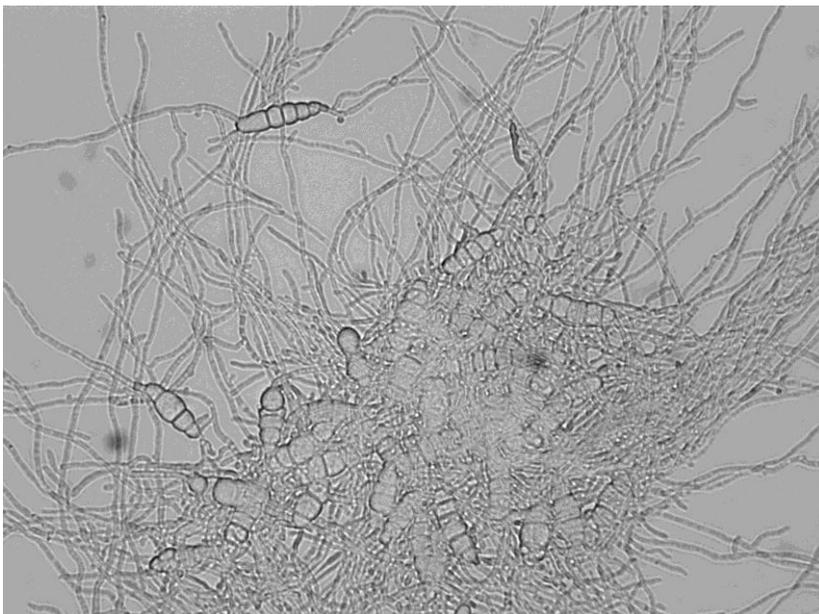
1.1 keine erkennbare Keimung der Konidien



1.2 beginnende Sprossung einer Konidie



1.3 zu weit fortgeschrittene Sprossung der Konidien



1.4 noch stärkere Sprossung mit Mycelbildung

**Abbildung 1.1-1.4: Beispielhafte Darstellung der Makrokonidiensprossung unter dem Lichtmikroskop mit 20-facher Vergrößerung.**

Die Vorkeimungszeiten, in der die beginnenden Sprossungen erreicht wurden, betragen für *T. rubrum* und *T. mentagrophytes* 12 Stunden und für *M. canis* und *E. floccosum* 6 Stunden.

Nach erfolgter Vorkeimung wurden die Konidien von der Sabouraud-Bouillon mittels Zentrifugieren getrennt und in NaPP aufgeschwemmt. In der Neubauer-Zählkammer wurde die Konzentration bestimmt und abermals auf 100 pro  $\mu\text{l}$  eingestellt.

## 2.8 Versuchsaufbau

Pro untersuchtem Stamm wurden in einer sterilen Mikrotiterplatte mit U-Boden (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in 14 Kammern jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Konidien suspension mit 100 Konidien pro  $\mu\text{l}$  steril pipettiert. Anschließend kamen in 4 Kammern jeweils 50  $\mu\text{l}$  NaPP, in 2 Kammern 50  $\mu\text{l}$  0,01 % Essigsäure, in 2 Kammern 50  $\mu\text{l}$  hBD-2 (0,1 mg/ml, bzw. final mit Konidienlösung 0,05 mg/ml, rekombinantes hBD-2, Planton GmbH, Kiel), in 2 Kammern 50  $\mu\text{l}$  RNase 7 (0,2 mg/ml, bzw. final mit Konidienlösung 0,1 mg/ml, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Harder, Universitäts-Hautklinik Kiel), in 2 Kammern 50  $\mu\text{l}$  Psoriasisin (0,3 mg/ml, bzw. final mit Konidienlösung 0,15 mg/ml, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder, Universitäts-Hautklinik Kiel) und in 2 Kammern 50  $\mu\text{l}$  Fluconazol (0,2 mg/ml, bzw. final mit Konidienlösung 0,1 mg/ml, Fragon Productos para Indústria de Borracha, Guarulhos, Spanien) hinzu.

Um Verunreinigungen oder sonstige Fehler auszuschließen, wurde jetzt die Platte mikroskopisch kontrolliert und es wurde eine erste Extinktionsmessung mit einem Mikrotiterplattenscanner (Sunrise, Software Magellan, Tecan, Männedorf, Schweiz) vorgenommen, bei der die Werte in den Versuchskammern ähnlich wie diejenigen der leeren Kammern sein sollten.

Für die Dauer von 2 Stunden wurde nun die Platte bei leichtem Schütteln in Dunkelheit bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum die Extinktion gemessen.

Darauf folgte in den ersten beiden Kammern die Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  NaPP und in den restlichen 12 Kammern jeweils 100  $\mu\text{l}$  Sabouraud-Bouillon.

Die Sabouraud-Bouillon wurde erst nach den 2 Stunden Inkubationszeit hinzugegeben, da Vorversuche gezeigt hatten, dass die AMPs durch sie inaktiviert werden.

Nach Zugabe der Bouillon wurde die Extinktion erneut gemessen, wobei in den Versuchskammern mit Sabouraud-Bouillon nun ein leicht erhöhter Wert gemessen wurde, da die Nährlösung etwas Licht absorbiert.

Die weiteren Extinktionsmessungen erfolgten über 7 Tage in 24-stündlichen Abständen.

Die ersten 2 Kammern, die nur Konidien und NaPP enthielten, dienten zur Kontrolle, dass ohne Sabouraud-Bouillon kein Wachstum stattfindet. Ihr Extinktionswert sollte also annähernd so klein bleiben wie der der unbefüllten Kammern.

Die nur mit Konidien, Natrium-Phosphat-Puffer und Sabouraud-Bouillon befüllten Kammern 3 und 4 sollten maximales Wachstum zeigen und somit die höchsten Extinktionswerte ergeben.

Kammer 5 und 6 sollten als Kontrollen nachweisen, dass die 0,01 % Essigsäure, mit der ja auch die AMPs gelöst wurden, keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis hat. Der Extinktionswert sollte also so hoch wie in den Kammern 3 und 4 sein.

In den Kammern 7 und 8 mit hBD-2, 9 und 10 mit RNase 7 und 11 und 12 mit Psoriasin waren die zu untersuchenden AMPs.

Die letzten beiden Kammern enthielten Fluconazol, ein bekanntermaßen wirksames Antimykotikum, das als Vergleich zu den AMPs dienen sollte (Wildfeuer und Seidl 1995).

## **2.9 Statistische Methoden**

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit SPSS 13.0 für Windows inklusive SPSS Advanced Models 12.0 (© SPSS Inc. 2004) und mit R Version 2.10.1 (2009-12-14, Copyright (C) 2009 The R Foundation for Statistical Computing) gerechnet.

Eine Beratung dafür fand durch Herrn Dipl. Inform. J. Hedderich, Leiter des Fachbereiches Biometrie und statistische Auswertungsprogramme am Institut für medizinische Informatik und Statistik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, statt.

Als erstes erfolgte eine multivariate Varianzanalyse (multivariate analysis of variance (MANOVA)) über alle Dermatophyten, Messtage, Wirkstoffe und Extinktionswerte.

Danach wurden Kovarianzanalysen (Analysis of covariance (ANCOVA)) mit den Extinktionsmesswerten für jeden Dermatophyt einzeln, jeweils für die Kontrolle und die 4 Wirkstoffe, durchgeführt, und zwar nach 3 und nach 7 Tagen, da hier nach der MANOVA die interessantesten Ergebnisse zu erwarten waren. Die Extinktion war die unabhängige Variable, die Zeit die kontinuierliche abhängige Variable und die Behandlung die kategorische abhängige Variable. Als statistisch signifikante Unterschiede wurden p-Werte  $<0,01$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

Die Messergebnisse der Versuchsreihen sind im Anhang in tabellarischer Form dargestellt.

#### 3.1 Vorversuche

In den Vorversuchen wurde festgestellt, dass die hemmende Wirkung der AMPs konzentrationsabhängig ist. So hemmte hBD-2 in der finalen Konzentration 0,05 mg/ml das Dermatophytenwachstum derartig, dass man innerhalb weniger Tage eine deutliche Differenz zu ungehemmtem Wachstum feststellen konnte. Mittels Verdünnungsreihen wurde klar, dass es höher konzentriert (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml) nur wenig mehr hemmte, niedriger konzentriert (0,0375 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,005 mg/ml) allerdings deutlich weniger. Für RNase 7 war 0,1 mg/ml die sinnvollste finale Konzentration und für Psoriasin 0,15 mg/ml.

Bei den Versuchen wurde eine initiale nährlösungsfreie Vorinkubation der Konidien mit den AMPs durchgeführt, da die Sabouraud-Bouillon in Vorversuchen eine inaktivierende Wirkung auf die AMPs offenbart hatte. Gab man AMPs also gleichzeitig mit der Sabouraud-Bouillon hinzu, entfalteten die AMPs kaum hemmende Wirkung auf das Dermatophytenwachstum. Die nährnde Sabouraud-Bouillon wurde daher erst nach 2-stündiger Inkubation mit den AMPs hinzugegeben.

Ebenso zeigte sich in Vorversuchen, dass die Wachstumshemmung bei Verwendung vorgekeimter Konidien schneller zu erkennen war als bei Einsatz ruhender Konidien. Die unvorgekeimten Konidien brauchten deutlich länger, um Extinktionsdifferenzen zwischen den Kammern messbar zu machen. Da die Sabouraud-Bouillon aber wie erwähnt die AMPs inaktiviert, mussten also bedingt durch den Versuchsaufbau vorgekeimte Konidien verwendet werden. Zu lange vorgekeimte Konidien ließen sich allerdings nicht mehr hemmen, weswegen letztendlich Konidien verwendet wurden, die gerade angefangen hatten auszusprossen.

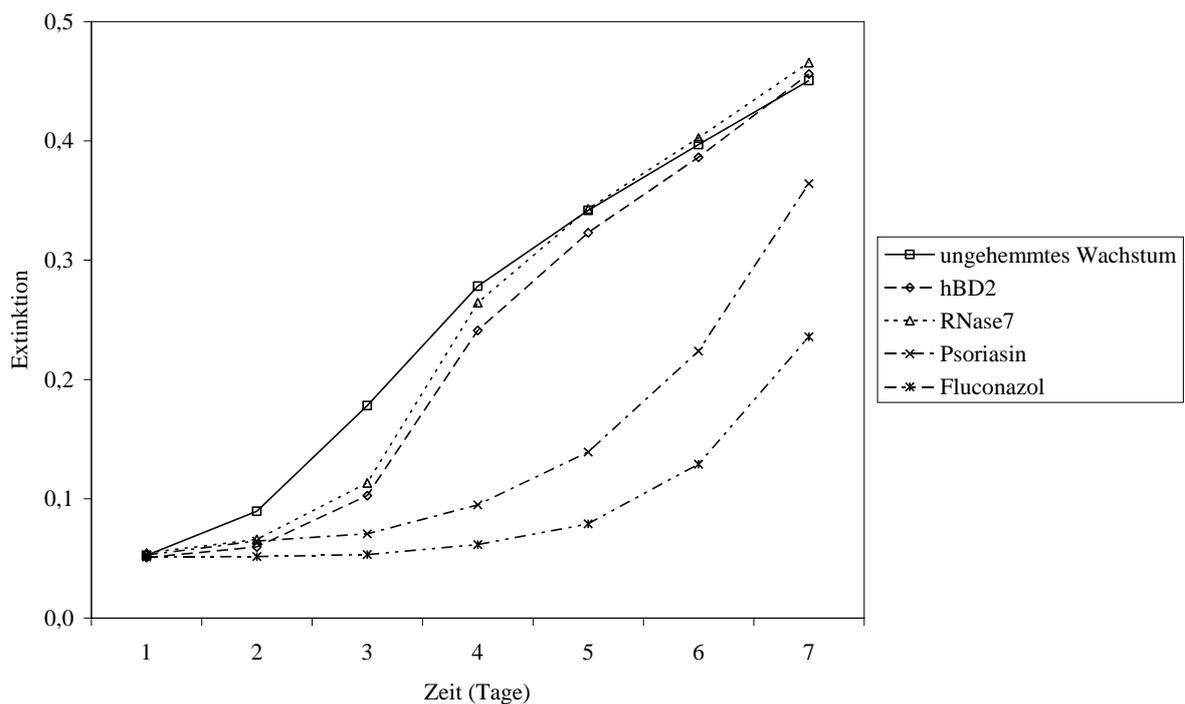
Auch wurde in Vorversuchen schnell klar, dass die einzelnen Dermatophytenarten unterschiedlich auf die AMPs reagieren. Daher wurden für die Hauptversuche die 3 Spezies verwendet, die am häufigsten bei Menschen in Deutschland eine Dermatophytose auslösen, ergänzt um *E. floccosum* als Repräsentant der Gattung *Epidermophyton*.

Ein weiterer Vorversuch wurde zum Vergleich von rekombinantem hBD-2 (Planton GmbH, Kiel) und natürlichem hBD-2 von Patienten der Universitäts-Hautklinik Kiel durchgeführt. Beide hBD-2-Arten hatten bei gleicher Konzentration eine fast gleiche hemmende Wirkung

auf das Dermatophytenwachstum. Daher wurde in den Hauptversuchen ausschließlich das besser verfügbare rekombinante hBD-2 eingesetzt.

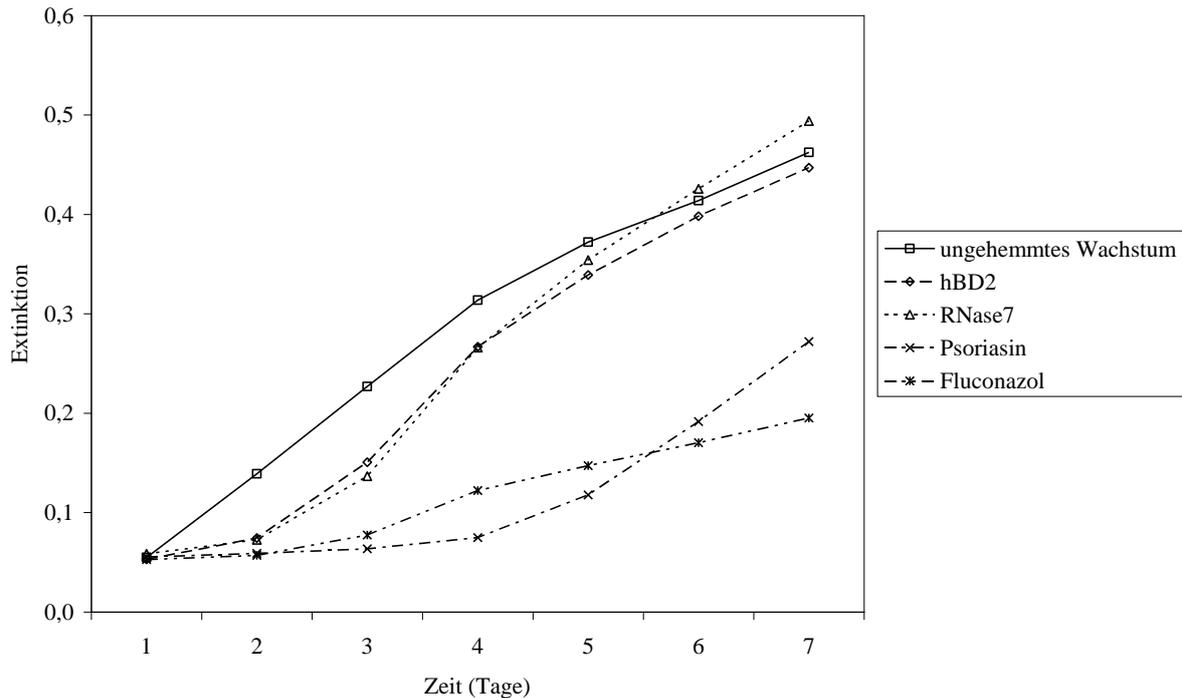
### 3.2 Hauptversuche

Bei jedem Versuch war in den Kammern, die nur mit Konidien und NaPP befüllt waren, kein Wachstum zu beobachten und zu messen. Die Kammern mit Konidien, Essigsäure und Sabouraud-Bouillon wiesen stets nahezu das gleiche Wachstum auf wie die Kammern mit Konidien, NaPP und Sabouraud-Bouillon. Dies ließ den Schluss zu, dass Essigsäure keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Das war notwendig, da die AMPs teilweise in Essigsäure gelöst werden mussten. Da diese 4 Kontrollkammern durchweg die erwarteten Ergebnisse erzielten, werden sie im Folgenden nicht mehr eigens erwähnt.



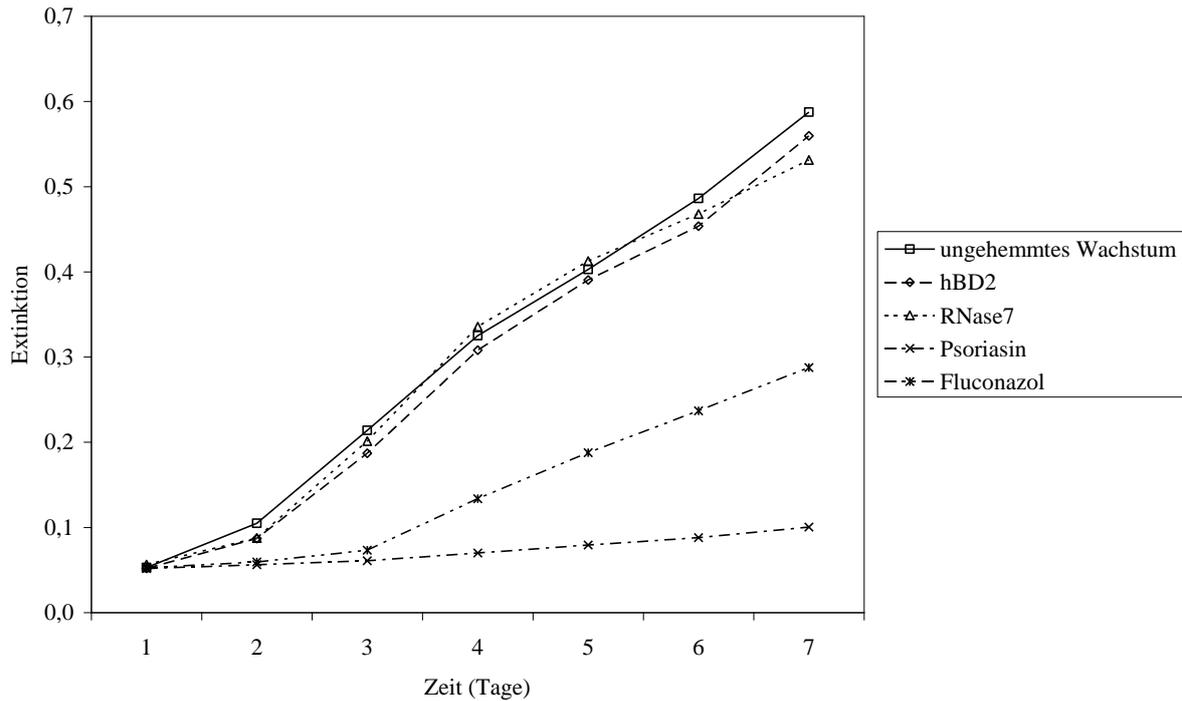
**Diagramm 1: Wirkung auf *T. rubrum* von 0,05 mg/ml hBD-2, 0,1 mg/ml RNase 7, 0,15 mg/ml Psoriasisin und 0,1 mg/ml Fluconazol im Vergleich zu ungehemmtem Wachstum. Es wurden Mittelwerte aus den 3 *T. rubrum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

Es zeigte sich, dass das Wachstum von *T. rubrum* unter dem Einfluss von hBD-2 und RNase 7 in den ersten drei Tagen deutlich gehemmt wurde, ab dem vierten Tag jedoch nicht mehr (Diagramm 1). Psoriasin dagegen hemmte das Wachstum über den kompletten Zeitraum der Messungen, und die Hemmung fiel auch stärker als bei hBD-2 und RNase 7 aus. Fluconazol hemmte stärker als die AMPs.



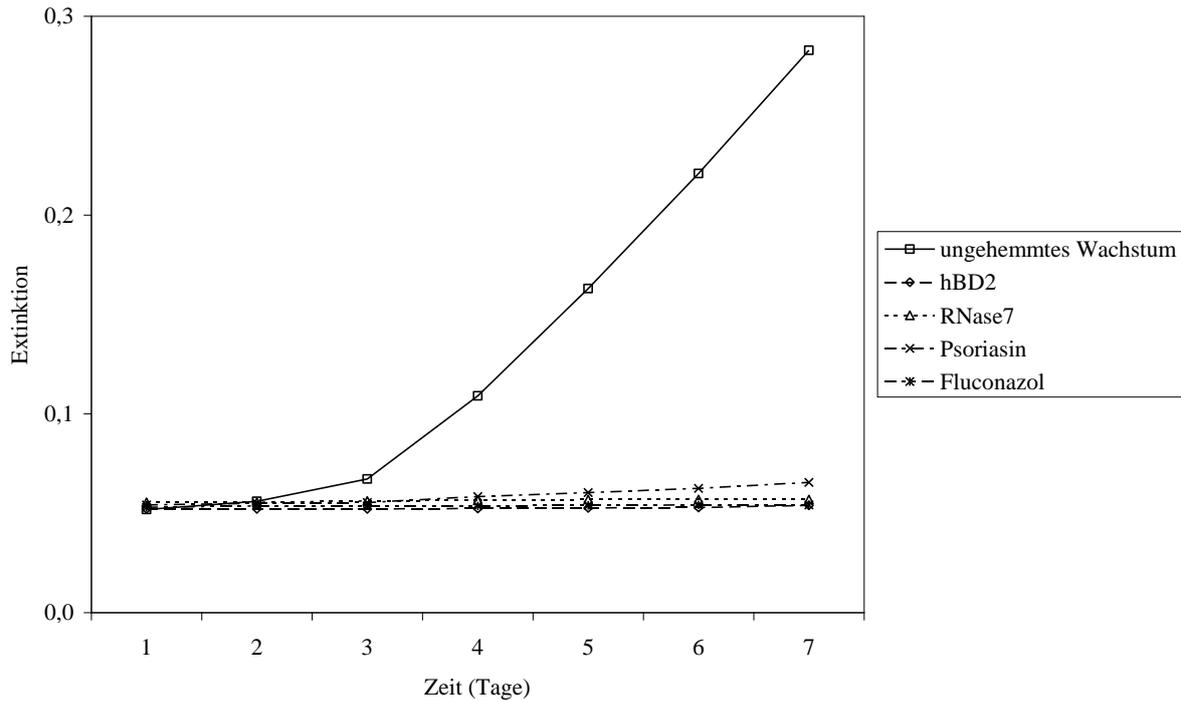
**Diagramm 2: Wirkung auf *T. mentagrophytes* von 0,05 mg/ml hBD-2, 0,1 mg/ml RNase 7, 0,15 mg/ml Psoriasin und 0,1 mg/ml Fluconazol im Vergleich zu ungehemmtem Wachstum. Es wurden Mittelwerte aus den 3 *T. mentagrophytes* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

Das Wachstum von *T. mentagrophytes* wurde ähnlich wie *T. rubrum* beeinflusst. hBD-2 und RNase 7 hemmten während der ersten 3 Tage, Psoriasin und Fluconazol deutlich länger und stärker (Diagramm 2).



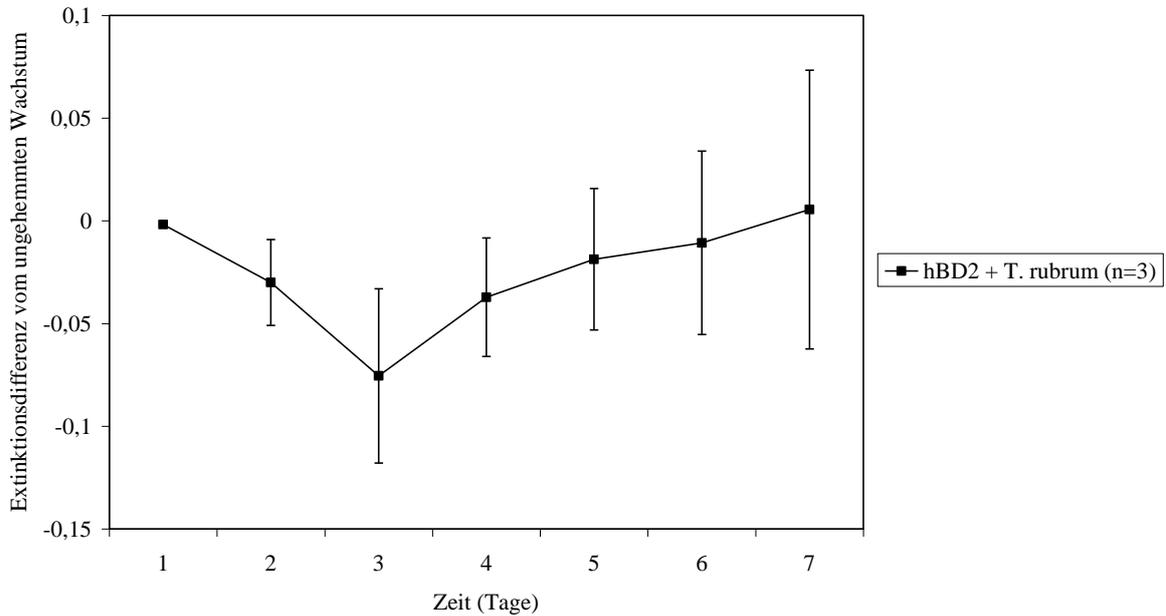
**Diagramm 3: Wirkung auf *M. canis* von 0,05 mg/ml hBD-2, 0,1 mg/ml RNase 7, 0,15 mg/ml Psoriasisin und 0,1 mg/ml Fluconazol im Vergleich zu ungehemmtem Wachstum. Es wurden Mittelwerte aus den 3 *M. canis* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*M. canis* hingegen wurde nur von Psoriasisin und Fluconazol gehemmt, hBD-2 und RNase 7 hatten so gut wie keinen Effekt (Diagramm 3). Aus diesem Grund wurde der Versuch erneut mit doppelten und vierfachen Konzentrationen durchgeführt. Auch hier konnte keine Wirkung beobachtet werden.



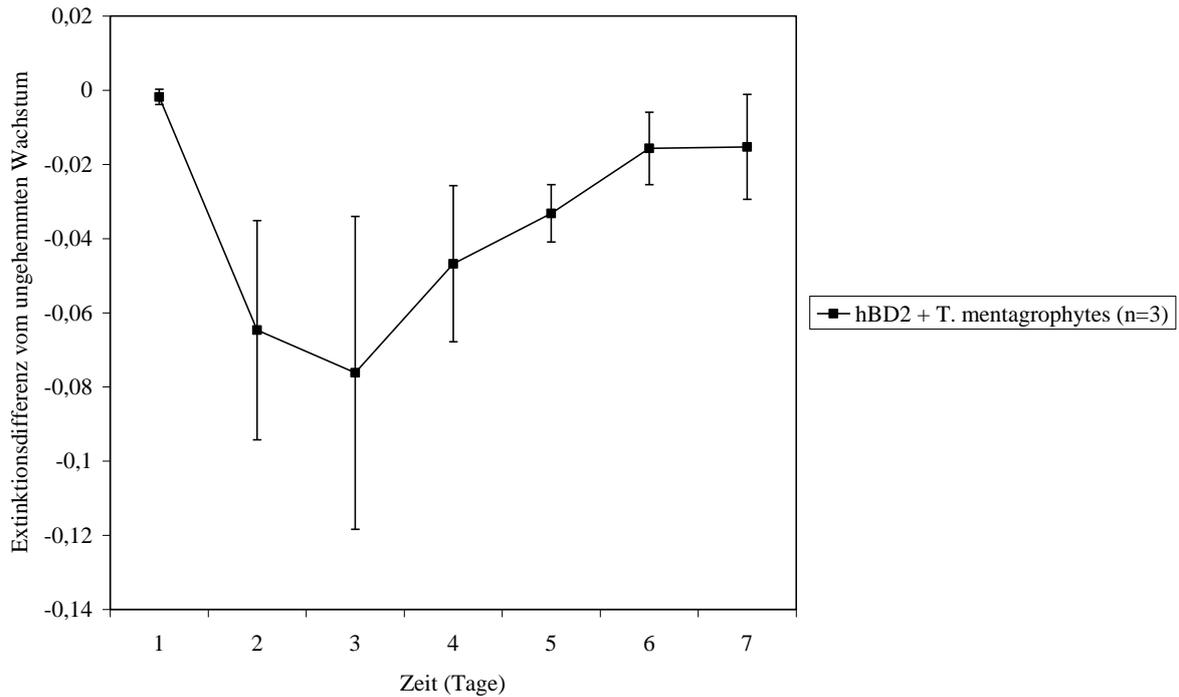
**Diagramm 4: Wirkung auf *E. floccosum* von 0,05 mg/ml hBD-2, 0,1 mg/ml RNase 7, 0,15 mg/ml Psoriasin und 0,1 mg/ml Fluconazol im Vergleich zu ungehemmtem Wachstum. Es wurden Mittelwerte aus den 3 *E. floccosum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*E. floccosum* wurde am effektivsten gehemmt. Alle 4 Wirkstoffe verhinderten das Wachstum nahezu komplett. Zu beachten ist auch, dass selbst bei ungehemmtem Wachstum nach 7 Tagen nicht einmal eine Extinktion von 0,3 erreicht wurde, was bedeutet, dass dieser Dermatophyt deutlich langsamer wuchs als die 3 anderen (Diagramm 4).



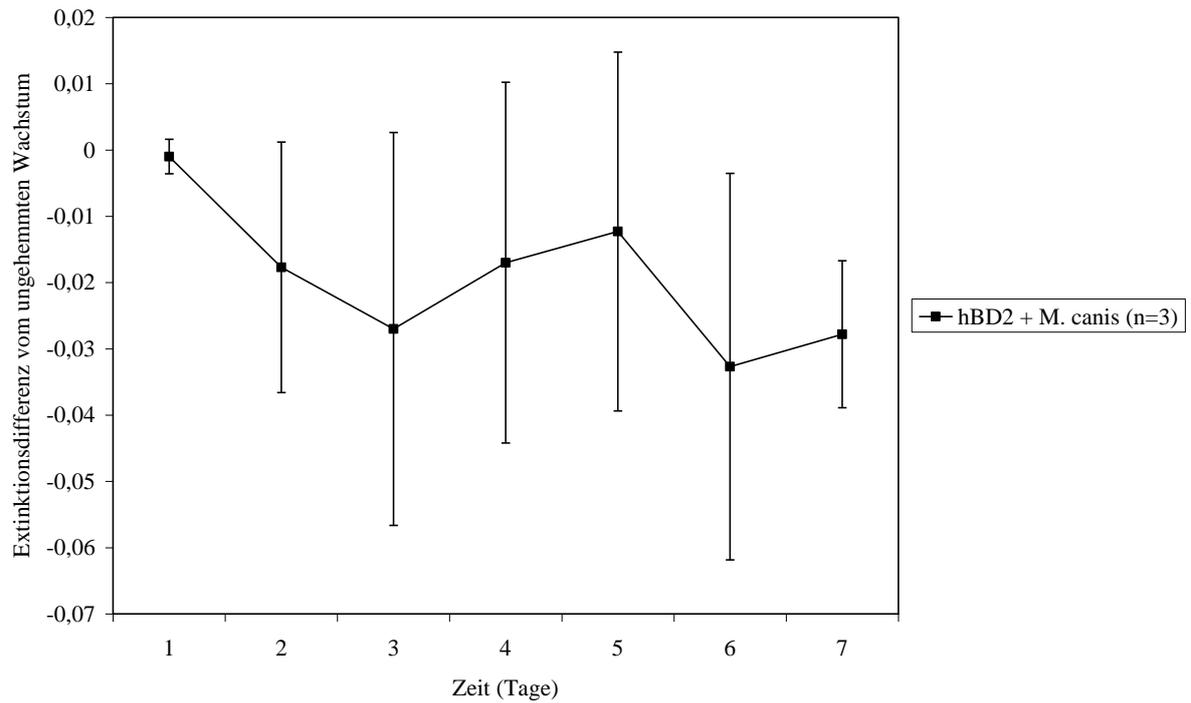
**Diagramm 5: Wirkung von 0,05 mg/ml hBD-2 auf *T. rubrum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. rubrum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

Bei der Betrachtung der Wirkung von hBD-2 auf *T. rubrum* fiel auf, dass an den ersten 3 Tagen eine Hemmung stattfand und danach nicht mehr (Diagramm 5).



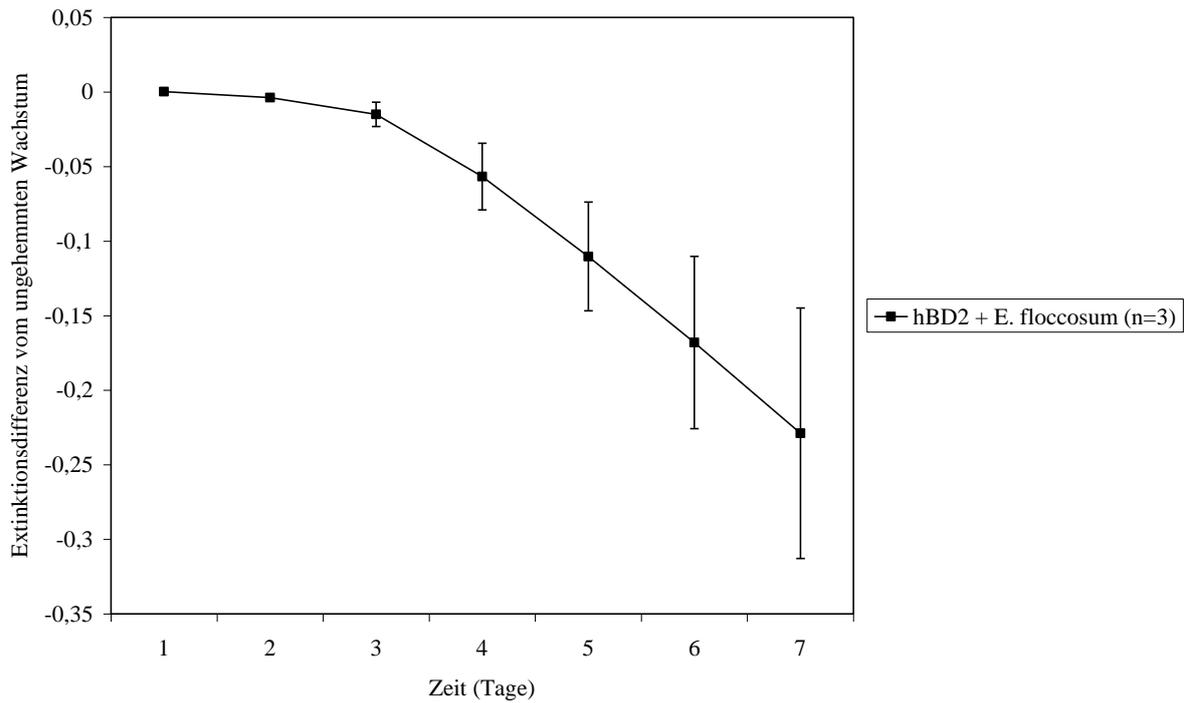
**Diagramm 6: Wirkung von 0,05 mg/ml hBD-2 auf *T. mentagrophytes*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. mentagrophytes* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. mentagrophytes* wurde ähnlich wie *T. rubrum* an den ersten 3 Tagen durch hBD-2 gehemmt und danach nicht mehr (Diagramm 6).



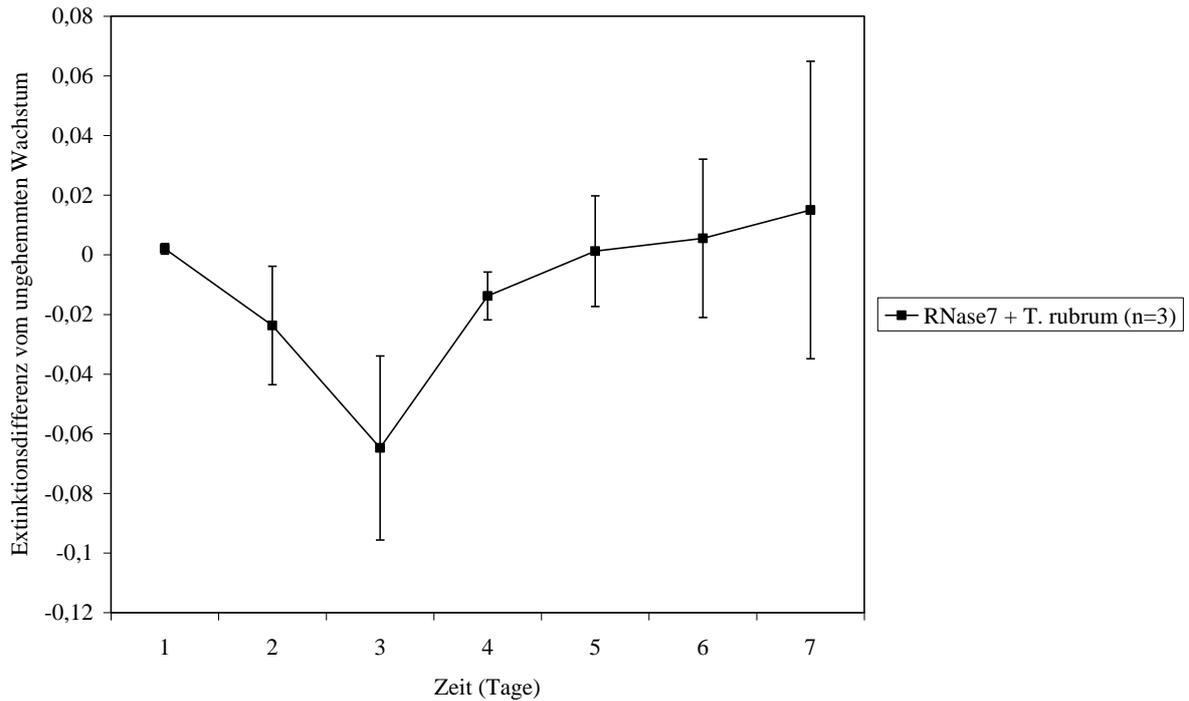
**Diagramm 7: Wirkung von 0,05 mg/ml hBD-2 auf *M. canis*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *M. canis* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*M. canis* wurde durch hBD-2 kaum gehemmt (Diagramm 7).



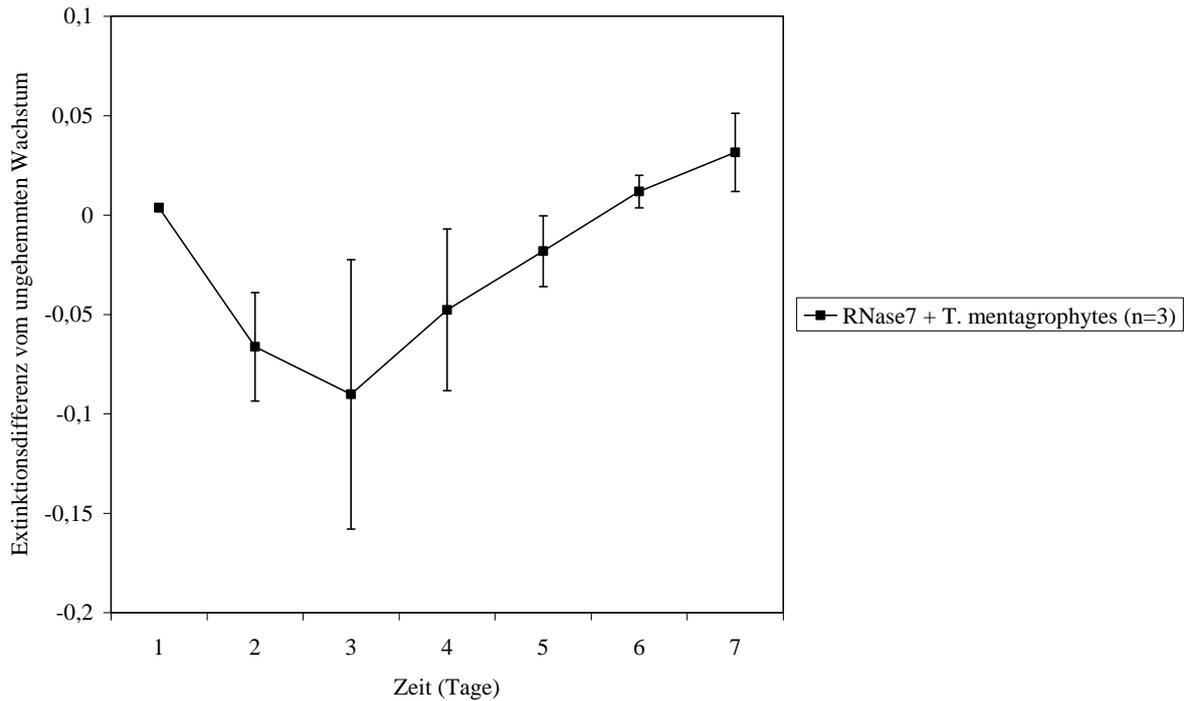
**Diagramm 8: Wirkung von 0,05 mg/ml hBD-2 auf *E. floccosum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *E. floccosum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*E. floccosum* wurde von hBD-2 über die komplette Messdauer effektiv gehemmt (Diagramm 8).



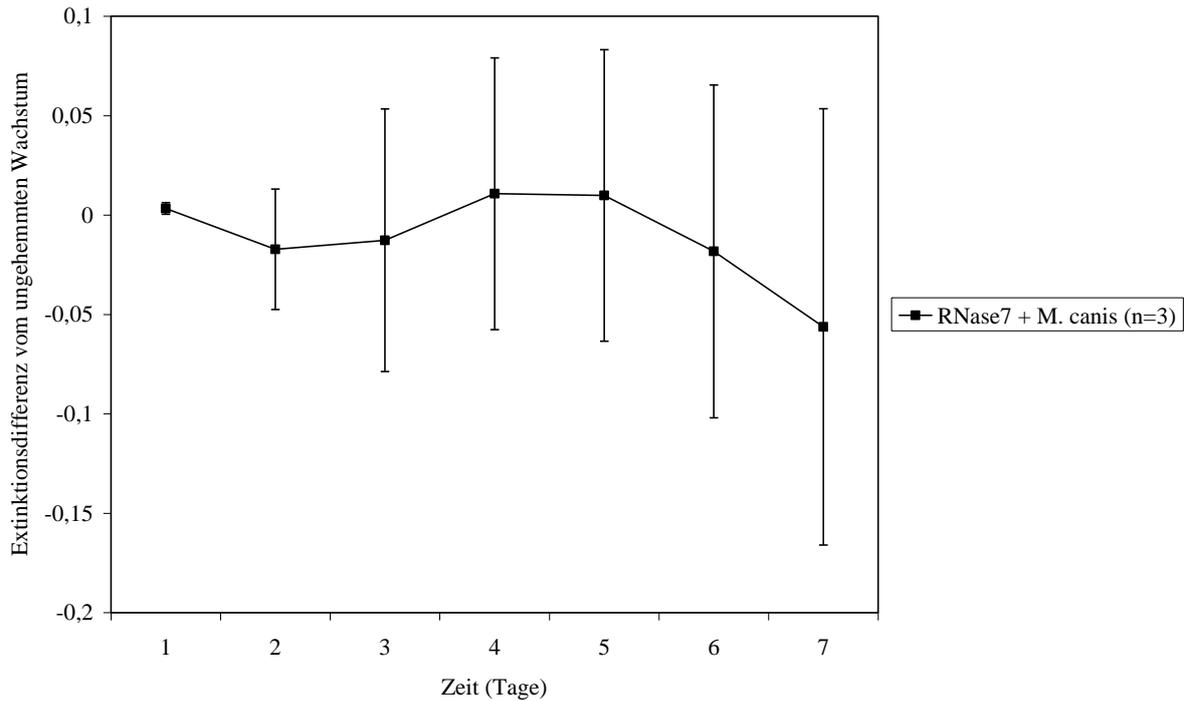
**Diagramm 9: Wirkung von 0,1 mg/ml RNase 7 auf *T. rubrum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. rubrum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. rubrum* wurde von RNase 7 an den ersten 3 Tagen gehemmt, danach kaum noch (Diagramm 9).



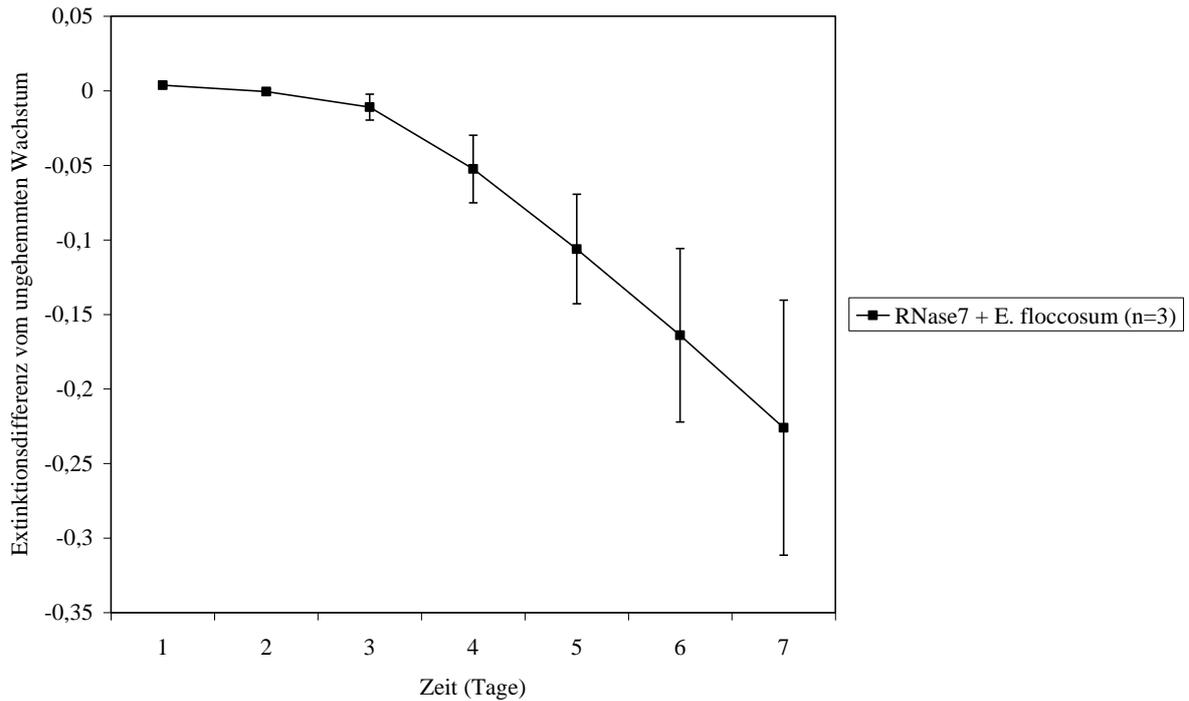
**Diagramm 10: Wirkung von 0,1 mg/ml RNase 7 auf *T. mentagrophytes*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. mentagrophytes* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. mentagrophytes* wurde durch RNase 7 ebenfalls an den ersten 3 Tagen gehemmt, danach immer weniger (Diagramm 10).



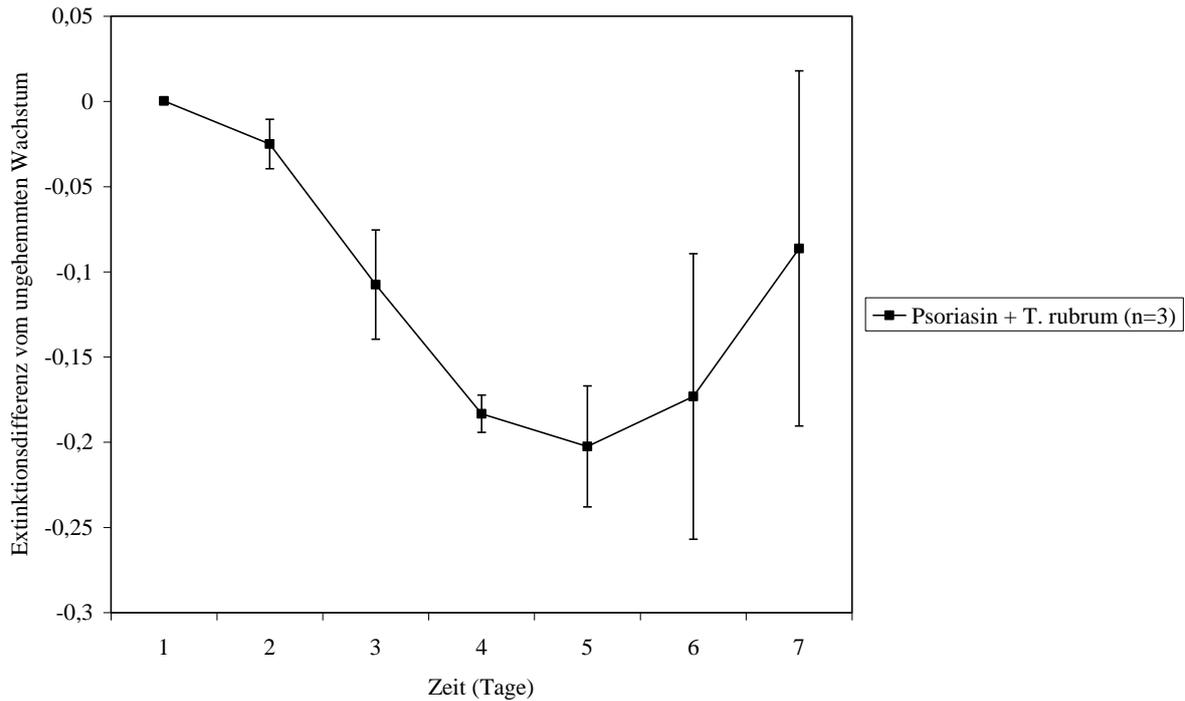
**Diagramm 11: Wirkung von 0,1 mg/ml RNase 7 auf *M. canis*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *M. canis* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*M. canis* wurde durch RNase 7 kaum gehemmt (Diagramm 11).



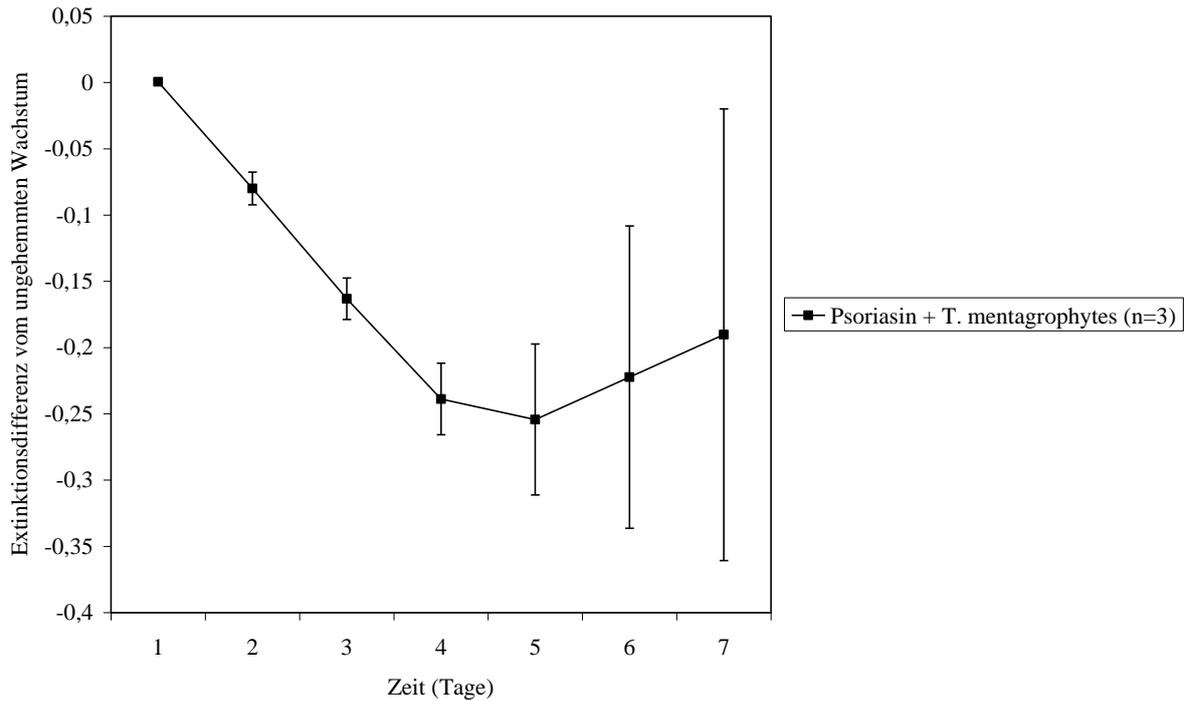
**Diagramm 12: Wirkung von 0,1 mg/ml RNase 7 auf *E. floccosum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *E. floccosum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*E. floccosum* wurde durch RNase 7 über alle Tage gehemmt (Diagramm 12).



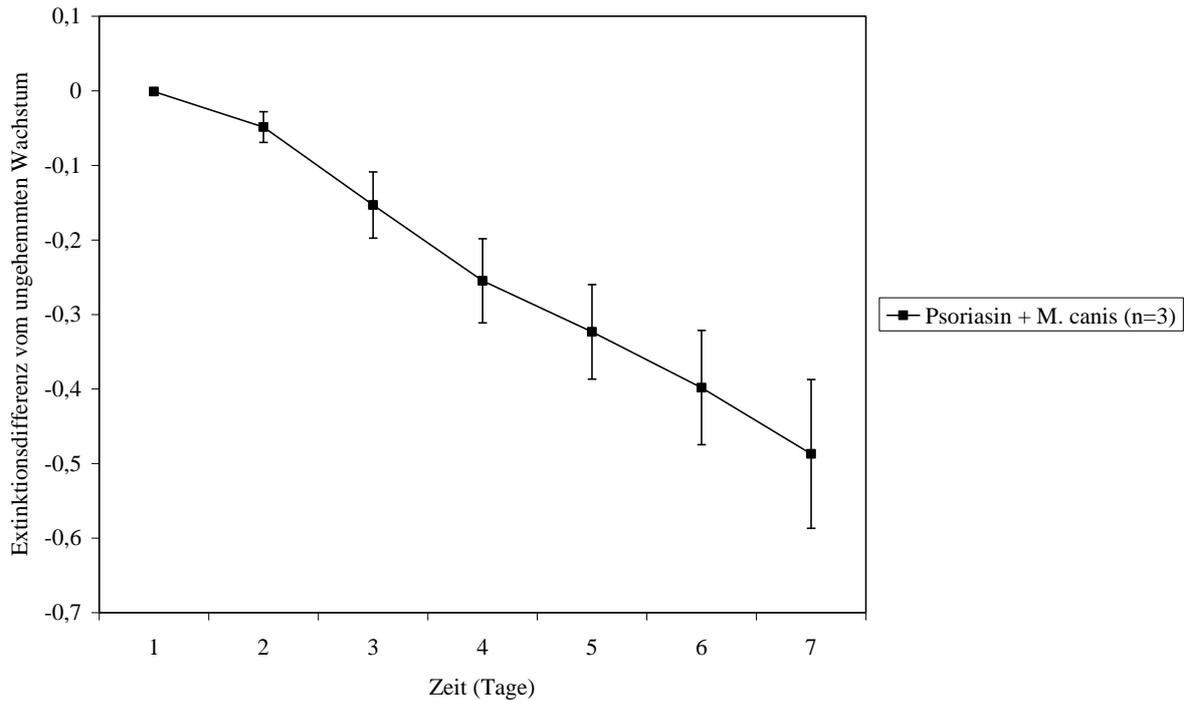
**Diagramm 13: Wirkung von 0,15 mg/ml Psoriasis auf *T. rubrum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. rubrum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. rubrum* wurde durch Psoriasis an den ersten 4 Tagen gehemmt, danach immer weniger (Diagramm 13).



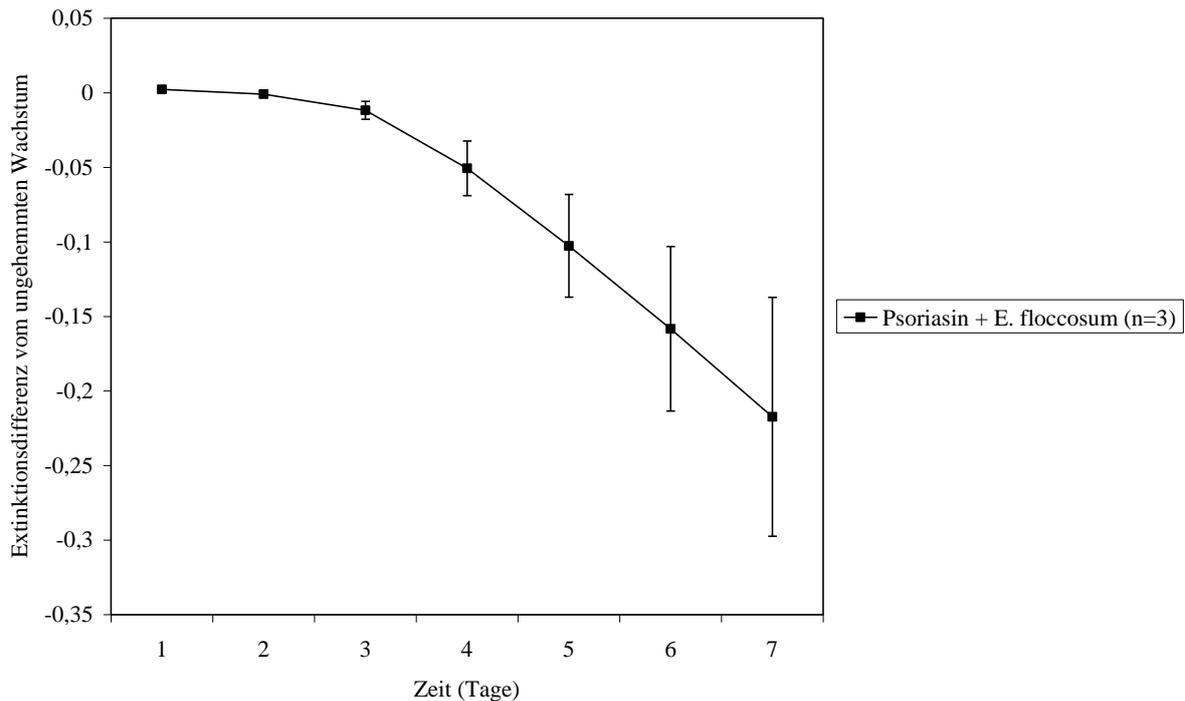
**Diagramm 14: Wirkung von 0,15 mg/ml Psoriasin auf *T. mentagrophytes*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. mentagrophytes* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. mentagrophytes* wurde ebenfalls von Psoriasin an den ersten 4 Tagen gehemmt, danach immer weniger (Diagramm 14).



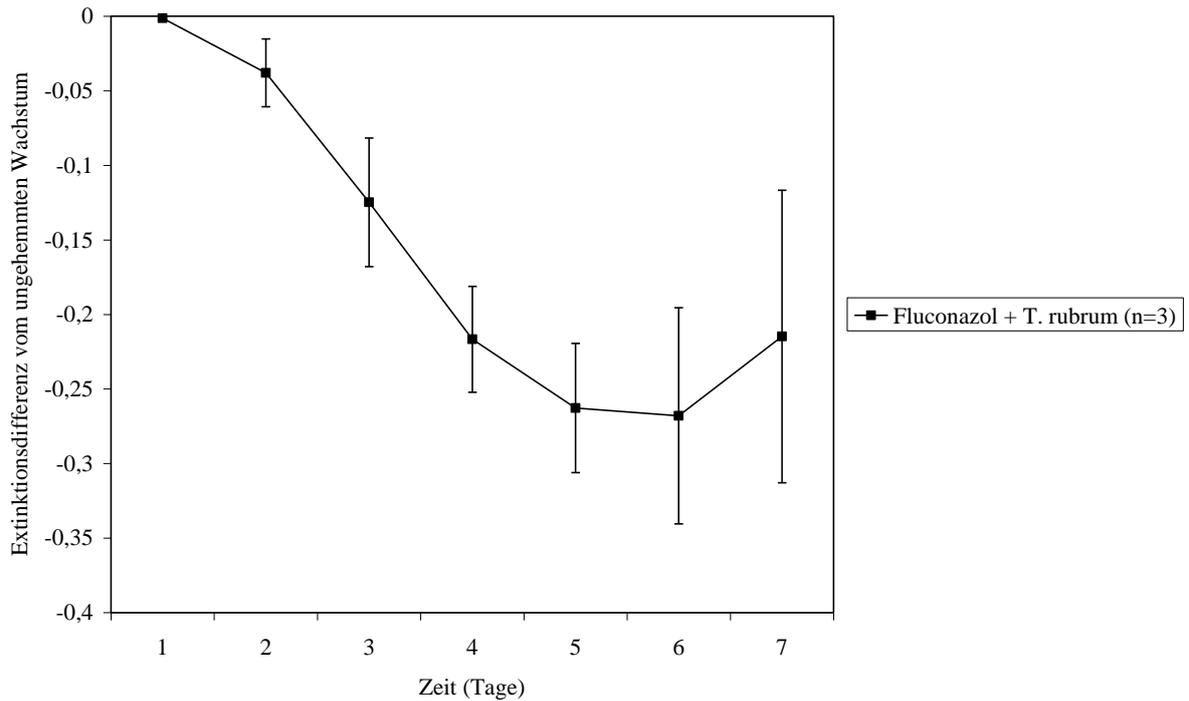
**Diagramm 15: Wirkung von 0,15 mg/ml Psoriasin auf *M. canis*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *M. canis* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*M. canis* wurde von Psoriasin an allen 7 Messtagen gehemmt (Diagramm 15).



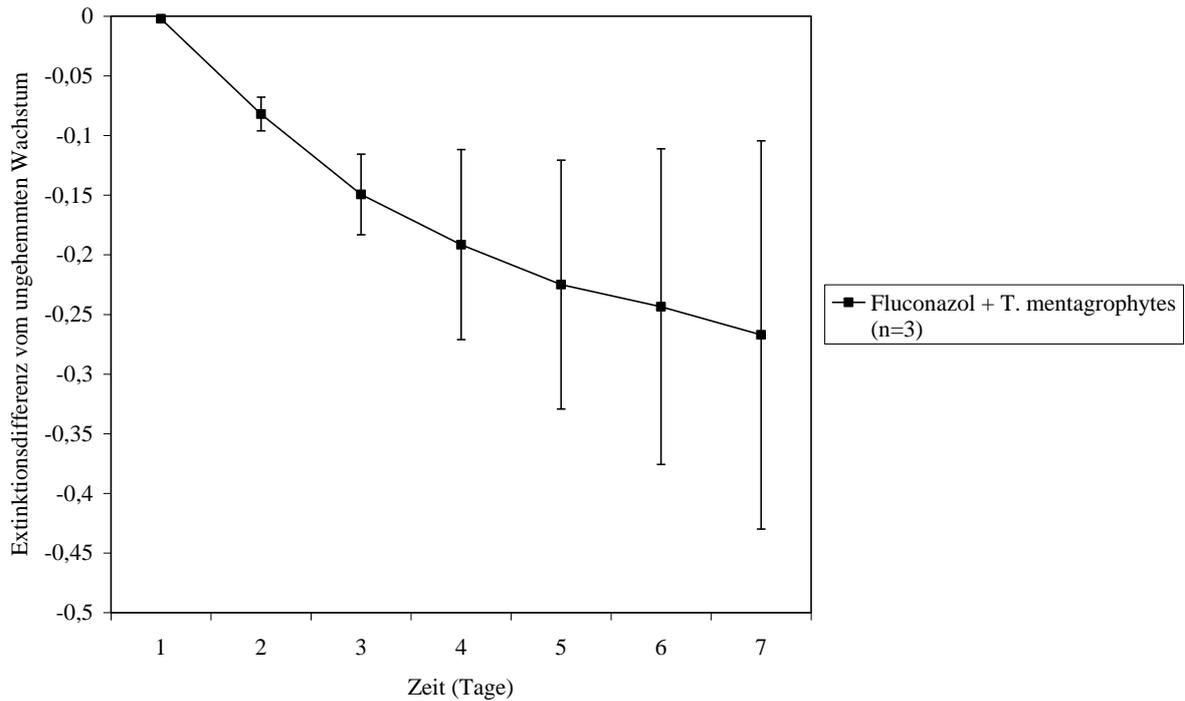
**Diagramm 16: Wirkung von 0,15 mg/ml Psoriasis auf *E. floccosum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *E. floccosum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*E. floccosum* wurde ebenfalls von Psoriasis an allen 7 Messtagen gehemmt (Diagramm 16).



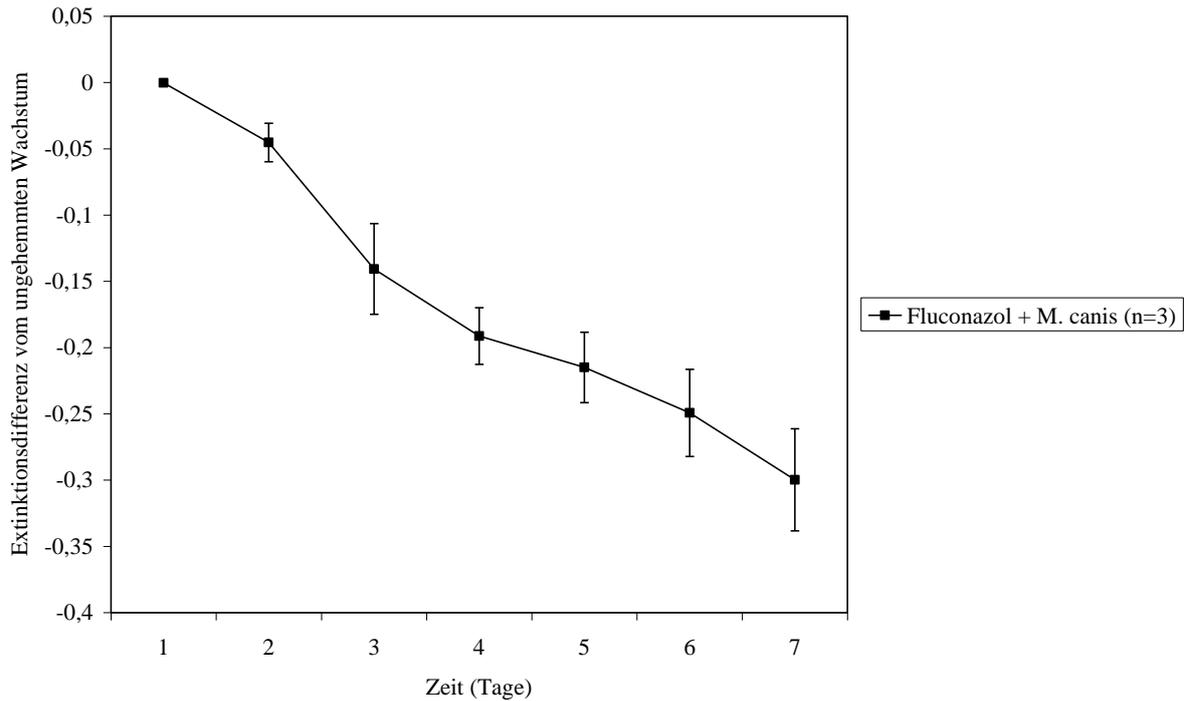
**Diagramm 17: Wirkung von 0,1 mg/ml Fluconazol auf *T. rubrum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. rubrum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. rubrum* wurde von Fluconazol die ersten 4 Tage gehemmt, danach ließ die Wirkung nach (Diagramm 17).



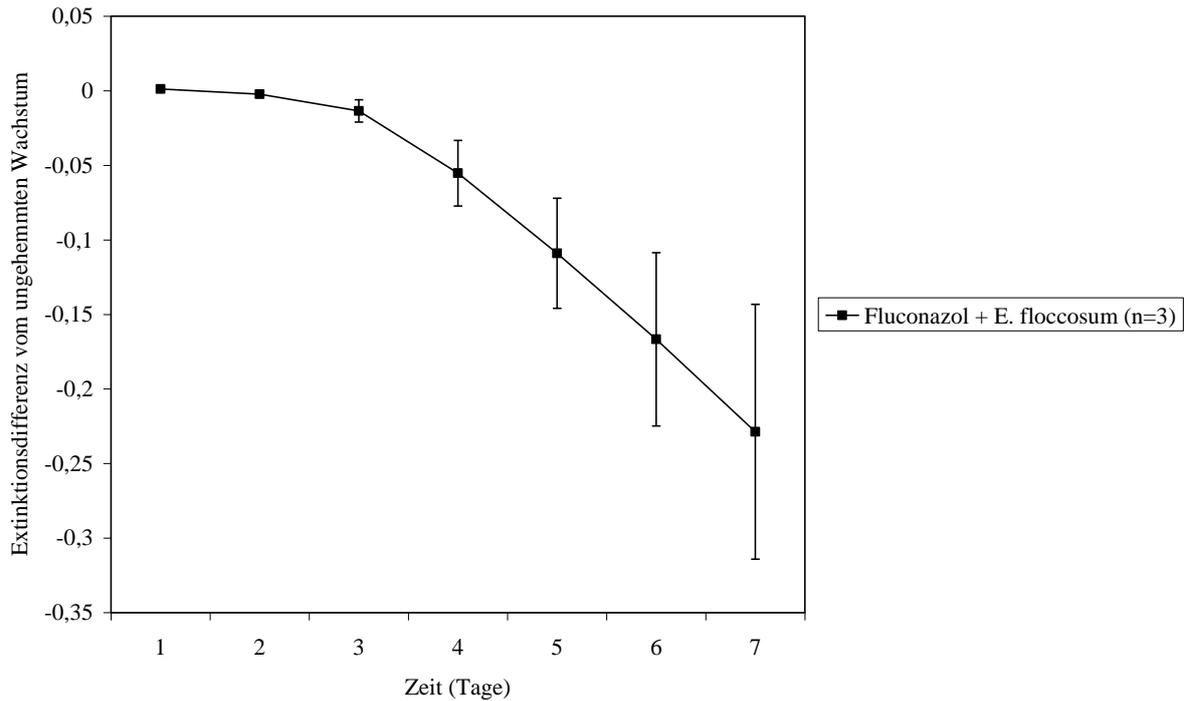
**Diagramm 18: Wirkung von 0,1 mg/ml Fluconazol auf *T. mentagrophytes*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *T. mentagrophytes* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*T. mentagrophytes* wurde von Fluconazol über alle 7 Tage gehemmt (Diagramm 18).



**Diagramm 19: Wirkung von 0,1 mg/ml Fluconazol auf *M. canis*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *M. canis* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*M. canis* wurde von Fluconazol ebenfalls über alle 7 Tage gehemmt (Diagramm 19).



**Diagramm 20: Wirkung von 0,1 mg/ml Fluconazol auf *E. floccosum*. Zur Veranschaulichung wurden Extinktionsdifferenzen aus den gemessenen Extinktionswerten von ungehemmtem Wachstum und hBD-2 und Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus den 3 *E. floccosum* Stämmen und den doppelten Versuchsansätzen gebildet.**

*E. floccosum* wurde von Fluconazol auch über alle 7 Tage gehemmt (Diagramm 20).

### 3.3 Statistische Analysen

Als erstes erfolgte eine MANOVA über alle Dermatophyten, Messtage, Wirkstoffe und Extinktionswerte.

	Wilks- $\lambda$	F	df	p
Zeit	0,098	4,604	6, 3	0,119
Zeit:Pilz	0,001	4,855	18, 9	0,01**

**Tabelle 1: Ergebnisse der MANOVA. Freiheitsgrade (degrees of freedom (df)) sind für Hypothese und Fehler dargestellt. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant (<0,001), \*\* signifikant (<0,01), \* moderat signifikant (<0,05).**

Die Ergebnisse der MANOVA zeigen zum einen, dass bei der Untersuchung der Wirkung der AMPs und Fluconazol auf alle Dermatophytenarten über den kompletten Zeitraum (Zeit) kein signifikanter Effekt auftrat, zum anderen aber auch, dass die Wirkstoffe die Dermatophyten signifikant unterschiedlich stark beeinflussen (Zeit:Pilz).

Um dem genauer auf den Grund zu gehen, erfolgten alle Analysen erneut separat für die 4 Dermatophytenarten und zum einen für die Messwerte nach 7 Tagen, zum anderen aber auch nur nach 3 Tagen, da an diesen Zeitpunkten die größten Effekte vermutet wurden.

Dafür wurde eine ANCOVA mit den Extinktionsmesswerten für jeden Dermatophyt einzeln, jeweils für die Kontrolle und die 4 Wirkstoffe, durchgeführt.

		df	Summe der Quadrate	F	p
<i>T. rubrum</i>	Zeit	1, 95	1,459	529,452	***
	Behandlung	4, 95	0,421	38,196	***
	Zeit:Behandlung	4, 95	0,159	14,39	***
<i>T. mentagrophytes</i>	Zeit	1, 95	1,323	559,63	***
	Behandlung	4, 95	0,541	57,187	***
	Zeit:Behandlung	4, 95	0,196	20,765	***
<i>M. canis</i>	Zeit	1, 95	1,664	1011,964	***
	Behandlung	4, 95	0,976	148,346	***
	Zeit:Behandlung	4, 95	0,452	68,693	***
<i>E. floccosum</i>	Zeit	1, 95	0,03	74,68	***
	Behandlung	4, 95	0,109	66,967	***
	Zeit:Behandlung	4, 95	0,104	63,723	***

**Tabelle 2: Ergebnisse der ANCOVA für alle 7 Tage. Freiheitsgrade (degrees of freedom (df)) sind für Hypothese und Fehler dargestellt. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant (<0,001), \*\* signifikant (<0,01), \* moderat signifikant (<0,05).**

		Steigung	Standardfehler	t	p
<i>T. rubrum</i>	Kontrolle	0,07	0,0057	12,3	***
	hBD-2	0,074	0,0081	0,52	
	RNase 7	0,076	0,0081	0,72	
	Psoriasin	0,047	0,0081	-2,87	**
	Fluconazol	0,026	0,0081	-5,46	***
<i>T. mentagrophytes</i>	Kontrolle	0,068	0,0053	12,908	***
	hBD-2	0,072	0,0075	0,478	
	RNase 7	0,079	0,0075	1,484	
	Psoriasin	0,034	0,0075	-4,514	***
	Fluconazol	0,025	0,0075	-5,681	***
<i>M. canis</i>	Kontrolle	0,091	0,0044	20,624	***
	hBD-2	0,088	0,0063	-0,547	
	RNase 7	0,085	0,0063	-0,905	
	Psoriasin	0,008	0,0063	-13,284	***
	Fluconazol	0,042	0,0063	-7,882	***
<i>E. floccosum</i>	Kontrolle	0,04	0,0022	18,132	***
	hBD-2	0,0003	0,0031	-12,737	***
	RNase 7	0,0003	0,0031	-12,737	***
	Psoriasin	0,0019	0,0031	-12,202	***
	Fluconazol	0,0002	0,0031	-12,766	***

**Tabelle 3: Ergebnisse der post-hoc Tests für alle 7 Tage. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant (<0,001), \*\* signifikant (<0,01), \* moderat signifikant (<0,05).**

		df	Summe der Quadrate	F	p
<i>T. rubrum</i>	Zeit	1, 35	0,02	59,758	***
	Behandlung	4, 35	0,015	11,709	***
	Zeit:Behandlung	4, 35	0,014	10,424	***
<i>T. mentagrophytes</i>	Zeit	1, 35	0,044	114,435	***
	Behandlung	4, 35	0,038	25,021	***
	Zeit:Behandlung	4, 35	0,025	16,672	***
<i>M. canis</i>	Zeit	1, 35	0,066	162,106	***
	Behandlung	4, 35	0,036	22,013	***
	Zeit:Behandlung	4, 35	0,032	19,551	***
<i>E. floccosum</i>	Zeit	1, 35	0,0001	8,546	**
	Behandlung	4, 35	0,0002	4,446	**
	Zeit:Behandlung	4, 35	0,0004	5,837	**

**Tabelle 4: Ergebnisse der ANCOVA für die ersten 3 Tage. Freiheitsgrade (degrees of freedom (df)) sind für Hypothese und Fehler dargestellt. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant (<0,001), \*\* signifikant (<0,01), \* moderat signifikant (<0,05).**

		Steigung	Standardfehler	t	p
<i>T. rubrum</i>	Kontrolle	0,063	0,0074	8,485	***
	hBD-2	0,026	0,0105	-3,522	**
	RNase 7	0,029	0,0105	-3,195	**
	Psoriasin	0,009	0,0105	-5,155	***
	Fluconazol	0,001	0,0105	-5,904	***
<i>T. mentagrophytes</i>	Kontrolle	0,086	0,008	10,803	***
	hBD-2	0,049	0,0113	-3,301	**
	RNase 7	0,039	0,0113	-4,167	***
	Psoriasin	0,004	0,0113	-7,269	***
	Fluconazol	0,012	0,0113	-6,544	***
<i>M. canis</i>	Kontrolle	0,081	0,0083	9,739	***
	hBD-2	0,068	0,0117	-1,112	
	RNase 7	0,073	0,0117	-0,684	
	Psoriasin	0,005	0,0117	-6,501	***
	Fluconazol	0,01	0,0117	-6,002	***
<i>E. floccosum</i>	Kontrolle	0,008	0,0014	5,62	***
	hBD-2	0	0,0019	-3,974	***
	RNase 7	0,0003	0,0019	-3,801	***
	Psoriasin	0,0006	0,0019	-3,672	***
	Fluconazol	0,0003	0,0019	-3,801	***

**Tabelle 5: Ergebnisse der post-hoc Tests für die ersten 3 Tage. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant (<0,001), \*\* signifikant (<0,01), \* moderat signifikant (<0,05).**

Vereinfacht dargestellt testet die ANCOVA, ob Geraden, die man durch jede der 5 Kurven der Diagramme 1-4 legt, Steigungen unterschiedlich von Null (Zeit) und Y-Achsen-Abschnitte unterschiedlich von Null (Behandlung) haben. Da bei allen Werten ein signifikanter Unterschied bestand (Tabellen 2 und 4), waren sowohl Steigung als auch Y-Achsenabschnitt der Wachstumskurven immer ungleich 0, die Dermatophyten wuchsen also. Die Interaktion (Zeit:Behandlung) stellt die wichtigsten Werte dar; sie zeigen, ob sich die Behandlungen, ausgedrückt in den Steigungen der Geraden, voneinander unterschieden, also ob sich mit Wirkstoffen behandelte Dermatophyten im Wachstum von den Kontrollen unterschieden und ob sich die Wirkstoffe in ihren Hemmwirkungen untereinander unterschieden. Wichtig zu wissen ist auch, dass bei den post-hoc Tests (Tabellen 3 und 5) die t-Werte der Kontrolle die Steigung gegen 0 testen, aber für die anderen Wirkstoffe testen sie die jeweilige Steigung gegen die Steigung der Kontrolle. Damit ermitteln die post-hoc Tests, welche der Wirkstoffe in ihrer Hemmwirkung effektiv waren.

Über alle 7 Messtage gab es signifikante Wachstumsunterschiede zwischen den Behandlungen für jede Dermatophytenart (Tabelle 2), aber nicht alle getesteten Wirkstoffe unterschieden sich signifikant von der Kontrolle (Tabelle 3): bei *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *M. canis* war keine signifikante Wachstumshemmung durch hBD-2 und RNase 7 zu erkennen, während das Wachstum unter Psoriasin und Fluconazol signifikant geringer ausfiel als in der Kontrolle. *E. floccosum* wurde dagegen durch alle 4 Wirkstoffe signifikant im Wachstum gehemmt (Tabelle 3).

Über die ersten 3 Messtage gab es ebenfalls für jede Dermatophytenart signifikante Unterschiede im Wachstum zwischen den Behandlungen (Tabelle 4), und bei *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *E. floccosum* war das Wachstum durch jeden Wirkstoff signifikant gehemmt (Tabelle 5). Nur bei *M. canis* gab es auch in den ersten 3 Messtagen keine signifikante Wachstumshemmung durch hBD-2 und RNase 7 (Tabelle 5).

Aufgrund dessen wurden zur Kontrolle erneut Versuche mit *M. canis* durchgeführt. Die Konzentrationen von hBD-2 und RNase 7 wurden hierfür verdoppelt, d.h. für hBD-2 auf 0,2 mg/ml (während Inkubationszeit 0,1 mg/ml, endgültige Konzentration 0,05 mg/ml) und für RNase 7 auf 0,4 mg/ml (während Inkubationszeit 0,2 mg/ml, endgültige Konzentration 0,1 mg/ml) erhöht. Dennoch war auch hier keine signifikante Wachstumshemmung festzustellen.

## 4. Besprechung der Ergebnisse (Diskussion)

Der hier angewendete Versuchsaufbau weicht von den gängigen in der Literatur beschriebenen Testverfahren für Antimykotika ab. Ein Beispiel für letztere ist die Agar- oder Bouillondilution, bei der die zu untersuchenden Substanzen im Nährboden oder der Nährflüssigkeit direkt gelöst werden und so auf die wachsenden Dermatophyten einwirken können. Zur Bewertung der Aktivität werden z.B. auf den Nährböden die Thallusdurchmesser der Dermatophyten beurteilt (Moursi und Refai 1968, Brasch und Gottkehaskamp 1992, Brasch und Flader 1996). Für die vorliegende Arbeit konnten diese Verfahren allerdings nicht verwendet werden, da die AMPs durch die Sabouraud-Bouillon inaktiviert werden und deswegen zuerst ohne Nährmedium auf die Dermatophyten einwirken müssen. Außerdem werden bei den gängigen Testverfahren Konidien mit Mycel verwendet, auf das die in dieser Arbeit verwendeten AMPs jedoch zu wenig Einfluss hatten. Mit einer Suspension aus leicht vorgekeimten Konidien konnten die deutlichsten Auswirkungen beobachtet werden. Die Gründe hierfür sollten künftig weiter erforscht werden. Das Ziel dieser Methode war mittels Photometrie nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen treffen zu können und eine statistische Auswertung zu ermöglichen.

### 4.1 humanes $\beta$ -Defensin-2

Die statistische Auswertung ergab folgende Ergebnisse für hBD-2:

1. Über alle 7 Messtage wurden *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *M. canis* nicht signifikant im Wachstum gehemmt, *E. floccosum* dagegen wurde signifikant gehemmt.
2. Über die ersten 3 Messtage wurden *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *E. floccosum* signifikant gehemmt und nur *M. canis* nicht.
3. Die hemmende Wirkung war zwar signifikant, aber mit den verwendeten Konzentrationen dennoch bei weitem nicht so stark wie die Fluconazolwirkung.

*T. rubrum* und *T. mentagrophytes* wurden zwar in den ersten 3 Tagen gehemmt, über 7 Tage war jedoch keine Hemmung mehr festzustellen. Das kann einerseits dadurch bedingt sein, dass diese Dermatophyten viele Mikrokonidien bilden und somit das vorhandene hBD-2 verbrauchen, z.B. indem sie es aufnehmen oder sogar verstoffwechseln. Es kann aber auch dadurch bedingt sein, dass sie einfach schnell wachsen und die Sabouraud-Bouillon das hBD-2 innerhalb kurzer Zeit inaktiviert.

*M. canis* wurde gar nicht durch hBD-2 gehemmt, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass dieser Dermatophyt überwiegend rauwandige Makrokonidien bildet, deren Membran vielleicht unbeeinflussbar durch hBD-2 ist. Da aber auch bei *E. floccosum* Makrokonidien beeinflusst und signifikant durch die AMPs gehemmt wurden, ist es unwahrscheinlich, dass allein die hohe Prozentzahl an Makrokonidien den Effekt der AMPs reduziert. Außerdem wurden vorgekeimte Konidien verwendet, wodurch die AMPs direkt auf die initialen Hyphen wirken konnten und somit ein Eindringen der AMPs in die Konidien zur Entfaltung ihrer Wirkung nicht erforderlich war. Es wäre also interessant, in der Zukunft Versuche mit reinen Suspensionen aus Makrokonidien, Mikrokonidien und Hyphen durchzuführen, um die Wirkungen auf diese unterschiedlichen Zellstrukturen der Dermatophyten zu differenzieren.

Nicht nur *M. canis* wird durch hBD-2 nicht gehemmt, es gibt auch einige Bakterien, wie z.B. *Burkholderia cepacia*, die überraschend resistent gegen hBD-2 sind (Schröder und Harder 2006, Baird et al. 1999). Es wird vermutet, dass die Zusammensetzung der bakteriellen Membran wichtig ist, z.B. könnte *Treponema denticola* wegen eines Mangels an Lipopolysacchariden (LPS) in der Membran resistent sein (Schröder und Harder 2006, Brissette und Lukehart 2002). Aber auch andere Gründe könnten eine Rolle spielen. Die Gruppe der A-Streptokokken, die „streptococcal inhibitor of complement“ (SIC) produzieren, können resistent gegen einige kationische AMPs, hBD-2 eingeschlossen, durch Bindung von SIC an die AMPs sein (Schröder und Harder 2006, Fernie-King et al. 2004).

*E. floccosum* wurde über die komplette Versuchsdauer gehemmt. Dies kann dadurch bedingt sein, dass dieser Dermatophyt von allen verwendeten das mit Abstand langsamste Wachstum aufwies. Betrachtet man die absoluten Extinktionswerte, fällt auf, dass selbst nach 7 Tagen die Kontrolle mit maximalem Wachstum nur einen Wert von 0,283 hat, was deutlich unter den Werten der anderen Dermatophyten liegt. Hätte man also noch weitere 7 Tage gemessen, würde eventuell die hemmende Wirkung auch hier nachlassen.

In der Literatur ist nur wenig zu finden über die Wirkung von hBD-2 auf Pilze. Überwiegend werden dabei mit *Candida (C.) albicans* Versuche durchgeführt, das von hBD-2 bereits bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen effektiv abgetötet wird. Hyphen von *C. albicans* sind wichtig bei der Regulierung der hBD-2 mRNA-Expression in primären menschlichen Mundepithelzellen. *C. albicans*, das hBD-2 ausgesetzt war, scheint unter dem Mikroskop eine Zerstörung der Zellmembran aufzuweisen. Das unterstützt die Hypothese, dass hBD-2 die Pilzkolonisation mittels direkter fungizider Aktivität und Inhibition der Candidaadhärenz kontrolliert (Feng et al. 2005). Eine andere Studie zeigt, dass hBD-2 und sein C-terminales Analog Phd2 antifungale Aktivität gegen *C. albicans* besitzen, wobei die minimale fungizide

Konzentration von hBD-2 bei 8  $\mu\text{M}$  und von Phd2 bei 18  $\mu\text{M}$  liegt. Phd2 hat also eine niedrigere Aktivität, ist aber auch weniger salzempfindlich als hBD-2 (Krishnakumari et al. 2009). Da der Interzellularraum zwischen den Keratinozyten in der Epidermis klein ist und hBD-2 lokal exprimiert wird, ist es allerdings sehr wahrscheinlich, dass lokale Konzentrationen von hBD-2 *in vivo* sehr viel höher sind als die minimale antimikrobielle Konzentration, die aufgrund dieser *in vitro* Studie kalkuliert wird (Harder und Schröder 2005, Liu et al. 2002).

Andere Studien ergeben teilweise gegensätzliche Befunde. Ein Beispiel ist, dass hBD-2 zusammen mit hBD-3 und hBD-4 im Ösophagus mehr exprimiert wird als im Magen und Duodenum. Die Ösophagusextrakte offenbarten allerdings schlechtere Aktivität gegen *C. albicans* (Hosaka et al. 2008). Ein weiteres Beispiel ist, dass hBD-2 fungizid gegen *C. albicans* im mikromolaren Bereich ist und bei der LD90 (Konzentration, die eine Verminderung koloniebildender Einheiten (Colony Forming Units (CFU)) um 90 % erreicht) kaum Schäden in den Membranen verursacht hat (Vylkova et al. 2007). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass durch den Einfluss von  $\beta$ -Defensinen deutliche morphologische Änderungen stattfinden, die auf eine Membranzerstörung hindeuten (Feng et al. 2005). Dieser Gegensatz kann seinen Ursprung in der Quelle der Defensine haben oder in unterschiedlicher Wirkung rekombinanter und natürlicher Defensine. Hier sollten weitere Nachforschungen betrieben werden.

Die Wirkung von hBD-2 auf Bakterien ist deutlich häufiger beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass natürliches, aus Psoriasis-Hautschuppen gewonnenes hBD-2 ein AMP ist, das bevorzugt gramnegative Bakterien wie *P. aeruginosa* und *E. coli* (LD90: 10 mg/ml) antimikrobiell beeinflusst. Weniger Aktivität zeigt es gegen *C. albicans* (LD90: 25 mg/ml) und nur bakteriostatische Aktivität gegen *S. aureus* (LD90: 100 mg/ml) (Schröder und Harder 2006, Harder et al. 1997). In Insektenzellen tötete künstlich hergestelltes rekombinantes hBD-2 sowohl *E. coli*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa*, als auch *S. aureus* (Schröder und Harder 2006, Harder und Schröder 2005, Liu et al. 2002, Bals et al. 1998, Singh et al. 1998). Außerdem zeigte synthetisches hBD-2 eine antimikrobielle Aktivität gegen mehrere parodontale Bakterien (Schröder und Harder 2006, Nishimura et al. 2004, Mineshiba et al. 2003). Die Fähigkeit von hBD-2, bakterielles Wachstum zu hemmen, hängt von der Ionenanordnung ab und lässt nach, wenn die Salzkonzentration (NaCl) von 20 auf 150 mM erhöht wird (Schröder und Harder 2006, Bals et al. 1998, Singh et al. 1998, Nishimura et al. 2004, Mineshiba et al. 2003, Tomita et al. 2000, Harder et al. 2000). Daher liegt die

Vermutung nahe, dass hBD-2 in Serum oder auf von Schweiß bedeckter Hautoberfläche keine antimikrobielle Wirkung mehr hat.

Obwohl die Wirkungsweise im Detail noch nicht genau belegt werden kann, konnte in der vorliegenden Arbeit hBD-2 erstmals eine wachstumshemmende Wirkung auf 3 der wichtigsten Dermatophytenarten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wirkung artabhängig unterschiedlich stark ist.

## 4.2 Ribonuklease 7

Für RNase 7 ergab die statistische Auswertung sehr ähnliche Ergebnisse wie für hBD-2:

1. Über alle 7 Messtage wurden *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *M. canis* nicht signifikant im Wachstum gehemmt, *E. floccosum* dagegen wurde signifikant gehemmt.
2. Über die ersten 3 Messtage wurden *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *E. floccosum* signifikant gehemmt und nur *M. canis* nicht.
3. Die hemmende Wirkung war zwar bei den getesteten Konzentrationen signifikant, aber dennoch bei weitem nicht so stark wie diejenige von Fluconazol.

Der einzige Unterschied zum hBD-2-Effekt bestand in der Konzentration, die bei RNase 7 doppelt so hoch war wie bei hBD-2. Dennoch sind die Ergebnisse erstaunlich, da in der Literatur eine antimykotische Aktivität von RNase 7 nicht beschrieben ist, von hBD-2 allerdings schon. Es konnte also in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass RNase 7 eine wachstumshemmende Wirkung auf *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* und *E. floccosum* hat. Wie bereits bei hBD-2 beschrieben, trat dieser Effekt allerdings nur an den ersten 3 Messtagen auf, danach nicht mehr.

Über die antibakterielle Aktivität der RNase 7 wurde mehrfach berichtet. So konnte gezeigt werden, dass RNase 7 an der *E. faecium* tötenden Aktivität von Hautextrakten mitwirkt und dass sie eine wichtige Rolle bei dem Schutz der menschlichen Haut gegen eine Kolonisierung mit *E. faecium* spielt (Köten et al. 2009). Weiterhin konnte bewiesen werden, dass bei einer *S. aureus*-Infektion die befallene Haut 64 % weniger RNase 7 enthält als gesunde Haut. Das lässt darauf schließen, dass RNase 7 eine Hauptrolle bei der permanenten Verteidigung der Haut gegen *S. aureus* spielt (Zanger et al. 2009). Tatsächlich gibt es Hinweise auf eine Induzierbarkeit von RNase 7 trotz der hohen konstitutiven Expression in gesunder Haut. Es ist nämlich möglich aus 1g gesundem Stratum corneum 4-8 µg RNase 7 zu isolieren (Schröder und Harder 2006, Harder und Schröder 2002), aus Psoriasissschuppen aber 10-25 µg/g

(Schröder und Harder 2006, Harder und Schröder 2005). Tatsächlich erhöhten aber auch die entzündungsfördernden Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , Interferon (IFN)- $\gamma$  und zu einem geringeren Grad auch Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) die RNase 7-messengerRNA (mRNA)-Expression in Keratinozyten. Abgesehen von Zytokinen induzierten auch durch Hitze getötete Bakterien die RNase 7-Expression in Keratinozyten (Harder und Schröder 2002). Bis heute ist der molekulare Mechanismus der Bakterien-vermittelten RNase 7 Induktion in Keratinozyten ungeklärt. Aminosäuresequenzanalysen und molekulare Klonen der entsprechenden komplementären DNA (cDNA) zeigten, dass RNase 7 Mitgliedern der RNase A-Familie ähnlich ist, unter ihnen RNase 2 (eosinophil-derived Neurotoxin (EDN)), RNase 3 (eosinophil-derived cationic Protein (ECP)) und RNase 5 (Angiogenin) (Schröder und Harder 2006, Hooper et al. 2003, Rosenberg und Domachowske 1999). Ausgehend von den überraschenden Ergebnissen der vorliegenden Studie könnte man in weiteren Versuchen also auch diese verwandten RNasen auf antimykotische Aktivitäten testen.

### 4.3 Psoriasisin

Die statistische Auswertung für Psoriasisin zeigte die stärkste dermatophytenhemmende Wirkung:

1. Psoriasisin hemmte sowohl über 3 als auch über 7 Tage alle Dermatophyten signifikant und am stärksten von allen 3 AMPs.
2. *M. canis* wurde mit den eingesetzten Konzentrationen von Psoriasisin sogar stärker gehemmt als durch Fluconazol.

Psoriasisin scheint also im Unterschied zu Defensinen und Cathelicidin (LL-37) ein anderes, deutlich effizienteres Potenzial zu haben, Dermatophyten im Wachstum zu hemmen. So haben ultrastrukturelle Analysen von mit Psoriasisin behandelten *E. coli* keine Zeichen von Perforation der Zellmembran offenbart. Interessanterweise ist die antimikrobielle Aktivität von Psoriasisin, das in wässriger Lösung als ein nicht kovalentes Dimer vorliegt, welches zwei halbe Zn<sup>2+</sup>-Bindungsstellen und zwei Ca<sup>2+</sup>-bindende EF-Hand-Motive pro Molekül enthält (Schröder und Harder 2006, Brodersen et al. 1999), empfindlich gegenüber einer Behandlung mit Zn<sup>2+</sup>, aber nicht mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup>. Das könnte darauf hinweisen, dass der Ausschluss von Zn<sup>2+</sup> der Mechanismus ist, wie Psoriasisin *E. coli* oder eben eventuell auch Dermatophyten tötet (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005). Diese Hypothese wird durch Experimente unterstützt, die zeigen, dass der Zn<sup>2+</sup> Chelator TPEN auch *E. coli* tötet,

und dass TPEN und Psoriasin überlagernde Effekte haben (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005).

Der genaue Mechanismus, durch den Psoriasin *E. coli* tötet, ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass  $Zn^{2+}$ -Entzug schlussendlich  $Zn^{2+}$ -abhängige Enzyme beeinträchtigt.  $Zn^{2+}$  sowie  $Cu^{2+}$  sind essentielle Transitionen für die funktionelle *E. coli*-Superoxyd-Dismutase (Schröder und Harder 2006, Gort et al. 1999). Dieses Enzym ist sehr empfindlich gegen Chelatoren von bivalenten Kationen (Schröder und Harder 2006, Benov et al. 1997) und wird fast exklusiv in der aeroben stationären Phase im Periplasma vieler gramnegativer Bakterien synthetisiert (Schröder und Harder 2006, Imlay 2003), was darauf hinweist, dass diese Bakterien ein besonderes Bedürfnis haben, sich gegen oxidative Schäden durch endogen erzeugte reaktive Sauerstoffarten zu verteidigen (Schröder und Harder 2006, Steinman 1993).  $Zn^{2+}$  sowie  $Cu^{2+}$  Kompartimentalisation könnte deshalb ein kritischer Schritt in der bakteriellen Verteidigung bei oxidativer Belastung sein. Psoriasin könnte Kompartimentalisation in seiner antimikrobiellen Tätigkeit ausnutzen, um somit durch  $Zn^{2+}$ -Entzug zum Untergang der Bakterien durch mangelnden Oxidationsschutz zu führen.

Einige andere Studien zeigten eine Beteiligung von S100-Proteinen an der angeborenen Immunabwehr. Calprotectin, ein nicht-kovalentes Heterodimer von S100A8 und S100A9, zeigte eine  $Zn^{2+}$ -abhängige, *C. albicans* betreffende biostatische Wirkung (Schröder und Harder 2006, Clohessy und Golden 1995, Murthy et al. 1993). Außerdem hatte ein kurzes C-terminales Peptidbruchstück von S100A12 die Fähigkeit, gramnegative Bakterien zu töten (Schröder und Harder 2006, Cole et al. 2001). Viele S100-Proteine werden in Epithelgewebe exprimiert (Schröder und Harder 2006, Eckert et al. 2004), was die Hypothese unterstützt, dass diese Proteine auch an der Verteidigung im Epithel beteiligt werden. Dass Psoriasin eine permanente chemische Verteidigung gesunder Haut gegen *E. coli* darstellt, zeigten auch andere Studien. Es wurde beobachtet, dass bestimmte Arten von Bakterien schnell auf der Oberfläche menschlicher Haut sterben, wohingegen andere Arten das nicht tun (Schröder und Harder 2006, Casewell und Desai 1983). Diese Unterscheidung konnte leicht durch die Kontamination von menschlichen Fingerkuppen entweder mit *E. coli* oder *S. aureus* in einer feuchten Atmosphäre für 30 Minuten demonstriert werden. In den anschließend von den Fingerkuppen angefertigten Abklatschkulturen wurde *S. aureus* nachgewiesen, aber kein Wachstum von *E. coli* (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005). Das würde auch erklären, warum man selten eine epidermale Kolonisierung mit *E. coli* beim Menschen findet (Schröder und Harder 2006, Noble 1992).

*In vitro* zeigt Psoriasin ebenfalls antimikrobielle Aktivität bevorzugt gegen *E. coli*, mit einer LD90 nahe 0,5  $\mu\text{M}$  (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005). Die Beobachtung, dass auch antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* bei viel höheren Konzentrationen (LD90 > 30  $\mu\text{M}$ ) vorliegt und Psoriasin für den saprophagen *S. epidermidis* nicht bakterizid ist (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005), lässt vermuten, dass die Psoriasinkonzentration gesunder Haut nur zwischen 0,5 und 30  $\mu\text{M}$  liegt. Eine antimikrobielle Aktivität von Psoriasin kann bei neutralem und saurem pH-Wert beobachtet werden, sowie bei erhöhter Konzentration von Salz (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005), was bei gesunden Hautoberflächen und bei Bedingungen festgestellt wurde, wenn Schweiß verdampft. Die Hemmung von Psoriasin durch einen spezifischen und neutralisierenden monoklonalen Antikörper *in vivo* und *in vitro* bestätigte, dass Psoriasin gegen *E. coli* das Haupt-AMP der gesunden Haut ist (Schröder und Harder 2006, Gläser et al. 2005). Eine Vorbehandlung der gesunden Haut mit Psoriasin-neutralisierenden Antikörpern führte auch zu einer Zunahme von Symbionten, was vermuten lässt, dass ein dauerhafter Psoriasinfilmm auf Hautoberflächen auch zur Wachstumskontrolle der symbiotischen Flora beitragen könnte.

Die vorliegende Arbeit reiht sich damit in die Literatur zur Wirkung von Psoriasin als effektive chemische Verteidigung der Haut ein, zeigt aber erstmals seine Wirkung auf die 4 verwendeten Dermatophytenarten. Der hier vorgestellte quantitative Vergleich mit anderen möglichen chemischen Verteidigungssystemen des menschlichen Epithels unterstreicht dabei den extrem hohen Wirkungsgrad von Psoriasin.

#### **4.4 Antimikrobielle Peptide**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten AMPs spielen eine sehr wichtige und noch längst nicht ausreichend erforschte Rolle bei der menschlichen Keimabwehr. Dass die Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris die Freisetzung der AMPs erhöhen kann, wurde mehrfach beschrieben (Gläser et al. 2005). Die Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) hingegen exprimiert weniger AMPs wie Cathelicidin, hBD-2, hBD-3 und Dermcidin, weswegen man bei solchen Patienten häufig eine Kolonisation der Haut mit *S. aureus* vorfindet (Hata und Gallo 2008, Gläser et al. 2009 a). Infektionen mit *E. coli* treten dagegen bei diesen Patienten nur sehr selten auf, was möglicherweise auf eine erhöhte Psoriasinexpression zurückzuführen ist. Eine vermehrte Expression von Psoriasin kann durch eine Zerstörung der Hautbarriere bei der AD ausgelöst werden, was eine Erklärung dafür

wäre, warum diese Patienten selten an einer kutanen *E. coli* Infektion leiden (Gläser et al. 2009 a).

In anderen Studien wurde die Expression von RNase 7, Psoriasin, hBD-2 und hBD-3 bei Patienten mit AD verglichen mit Psoriasispatienten und gesunden Kontrollen, sowie nach experimenteller Barrierezerstörung der Haut. Sowohl Haut von Patienten mit AD als auch mit Psoriasis wies eine höhere Expressionsrate aller AMPs auf als die Haut von Gesunden. Barrierezerstörung hatte eine Erhöhung der RNase 7-Produktion schon nach einer Stunde, der hBD-2- und hBD-3-Produktion nach 24 Stunden zur Folge. Die Barrierezerstörung durch AD oder Psoriasis könnte also die Expression von AMPs auslösen (Harder et al. 2010, Gambichler et al. 2008). Diese Gegensätze gilt es weiter zu erforschen. Auch ist wichtig, dass die mRNA-Expression von hBD-2, RNase 7 und Psoriasin in Epithelzellen der Mundschleimhaut durch das zeitabhängige Stadium eines Biofilms beeinflusst wird. Ein wenige Tage alter Biofilm führt zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von hBD-2, RNase 7 und 5-Lipoxygenase (5-LO), wohingegen ein länger gereifter Biofilm die Interleukin-8 (IL-8) mRNA-Expression erhöht (Eberhard et al. 2008).

Bei Mäuseaugen, die durch Infektion mit *C. albicans* eine Keratomykose aufwiesen, konnte nachgewiesen werden, dass initial hBD-1 und hBD-2 weniger exprimiert wurden und erst später wieder normale Konzentrationen erreichten. Im Gegensatz dazu wurde vermehrt Cathelicidin und das für dessen Expression verantwortliche CAMP-Gen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass Cathelicidin eine Hauptrolle bei der Immunantwort auf korneale Infektionen spielt und hBD-2 offenbar hier nicht relevant ist (Yuan et al. 2010).

#### **4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass hBD-2, RNase 7 und Psoriasin Dermatophyten unter bestimmten Bedingungen *in vitro* sehr effektiv hemmen können.

Künftige Untersuchungen müssen ergründen, ob diese AMPs für therapeutische Zwecke und eine Infektionsprophylaxe eingesetzt werden können und ob vielleicht auch die artifizielle Induktion einer endogenen Produktion dieser Peptidantibiotika in der Haut als prophylaktischer Infektionsschutz geeignet ist, insbesondere da man weiß, dass manche Krankheiten wie zum Beispiel Morbus Crohn (Fellermann et al. 2006) mit zu niedriger AMP-Konzentration zusammenhängen können.

UV-Strahlung übt Effekte auf das Immunsystem aus. Sie unterdrückt das adaptive Immunsystem, stimuliert aber manche Mechanismen des unspezifischen Abwehrsystems. Das

kann erklären, warum T-Zellvermittelte Immunreaktionen unterdrückt werden, aber nicht angeborene Abwehrreaktionen gegen bakterielle Angriffe (Gläser et al. 2009 b). Eventuell kann man diesen Effekt therapeutisch nutzen, um die AMP-Expression zu fördern.

## 5. Zusammenfassung

Dermatophyten sind Fadenpilze, die die oberflächlichen Hautschichten infizieren können. Ihre phylogenetische Entwicklung verlief synchron mit der Entwicklung der Landsäugetiere. Daher ist zu vermuten, dass letztere eine Art der natürlichen Abwehr gegen Dermatophyten entwickelt haben. Neuere Untersuchungen haben tatsächlich antimikrobielle Eigenschaften von Faktoren der angeborenen Immunabwehr gezeigt, die innerhalb der Haut exprimiert werden können.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von humanem  $\beta$ -Defensin-2, Ribonuklease 7 und Psoriasin auf Dermatophyten getestet. *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* und *Epidermophyton floccosum* wurden ausgewählt, da damit die häufigsten Arten, die in Deutschland beim Menschen Dermatophytosen auslösen, und alle drei Dermatophytengattungen erfasst sind. Drei Stämme jeder Art wurden von unterschiedlichen Patienten isoliert. Für die antimykotischen Experimente wurden die Dermatophyten *in vitro* Lösungen mit humanem  $\beta$ -Defensin-2, Ribonuklease 7 und Psoriasin im Vergleich zu Fluconazol und zu Negativkontrollen ausgesetzt. Die Versuche wurden mit Konidien durchgeführt, die von Kulturplatten geerntet worden waren und die nach einer Vorkeimungszeit eine initiale Sprossung ausgebildet hatten. Das Wachstum der Hyphen unter dem Einfluss der Testsubstanzen wurde mikroskopisch und photometrisch über einen Zeitraum von 168 Stunden kontrolliert. Alle Versuchsreihen wurden doppelt durchgeführt. Die photometrischen Werte wurden für eine statistische Auswertung benutzt.

Eine Hemmung war bei allen Testsubstanzen und Konidienarten mit zwei Ausnahmen, humanem  $\beta$ -Defensin-2 und Ribonuklease 7 mit *Microsporum canis*, zu beobachten. Das Mycelwachstum war innerhalb der ersten drei Tage abhängig von Dermatophytenart und Testsubstanz im Vergleich zu Kontrollen signifikant reduziert. Die stärkste Hemmung verursachte Psoriasin, das bei der Dermatophytenart *Microsporum canis* sogar effektiver war als das zur Kontrolle mitgeführte stark wirksame Antimykotikum Fluconazol.

Die Ergebnisse zeigen, dass Faktoren des menschlichen natürlichen Abwehrsystems, die in der Haut exprimiert werden können, die Fähigkeit haben, unter geeigneten Bedingungen das Wachstum von Dermatophyten zu hemmen. Ob die getesteten Substanzen allerdings auch *in vivo* relevant für den Schutz vor Dermatophyten sind, muss noch durch die Analyse ihrer Aktivität bei einer realen Infektion erforscht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Ali, R. S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C. E., Cerio, R., Quinn, A. G. (2001): Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 117: 106–111.

Baird, R. M., Brown, H., Smith, A. W., Watson, M. L. (1999): *Burkholderia cepacia* is resistant to the antimicrobial activity of airway epithelial cells. *Immunopharmacology* 44: 267–272.

Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., et al. (1998): Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* 102: 874–880.

Benov, L., Sage, H., Fridovich, I. (1997): The copper- and zinc-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*: molecular weight and stability. *Arch. Biochem. Biophys.* 340: 305–310.

Brasch, J. (2009): Current knowledge of host response in human tinea. *Mycoses.* 52: 304-312.

Brasch, J. (2010): Pathogenesis of tinea. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 8: 780-786.

Brasch, J., Flader, S. (1996): Human androgenic steroids affect growth of dermatophytes in vitro. *Mycoses.* 39 (9-10): 387-392.

Brasch, J., Gottkehaskamp, D. (1992): The effect of selected human steroid hormones upon the growth of dermatophytes with different adaptation to man. *Mycopathologia.* 120 (2): 87-92.

Brissette, C. A., Lukehart, S. A. (2002): *Treponema denticola* is resistant to human beta-defensins. *Infect. Immun.* 70: 3982–3984.

Brodersen, D. E., Nyborg, J., Kjeldgaard, M. (1999): Zincbinding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn<sup>2+</sup>-loaded and Zn<sup>2+</sup>-free states. *Biochemistry*. 38: 1695–1704.

Brogden, K. A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (3): 238-250.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C. (1996): *The fungi*. London, Academic Press Limited.

Casewell, M. W., Desai, N. (1983): Survival of multiply-resistant *Klebsiella aerogenes* and other Gram-negative bacilli on finger-tips. *J. Hosp. Infect.* 4: 350–360.

Clohessy, P. A., Golden, B. E. (1995): Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence. *Scand. J. Immunol.* 42: 551–556.

Dale, B. A., Krisanaprakornkit, S. (2001): Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J. Oral. Pathol. Med.* 30: 321–327.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J. (2000): *Atlas Of Clinical Fungi*, 2nd edn. Spain: ASM Press.

Eberhard, J., Menzel, N., Dommisch, H., Winter, J., Jepsen, S., Mutters, R. (2008): The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human beta-defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators: a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms. *Oral. Microbiol. Immunol.* 23 (1): 21-28.

Eckert, R. L., Broome, A. M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D., Lee, K. (2004): S100 proteins in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 123: 23–33.

Fellermann, K., Stange, D. E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C. L., Reinisch, W., Teml, A., Schwab, M., Lichter, P., Radlwimmer, B., Stange, E. F. (2006): A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am. J. Hum. Genet.* 79 (3): 439-448.

- Feng, Z., Jiang, B., Chandra, J., Ghannoum, M., Nelson, S., Weinberg, A. (2005): Human Beta-defensins: Differential Activity against Candidal Species and Regulation by *Candida albicans*. *J. Dent. Res.* 84 (5): 445-450.
- Fernie-King, B. A., Seilly, D. J., Lachmann, P. J. (2004): The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensins. *Immunology.* 111: 444–452.
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Othlinghaus, N., Brockmeyer, N. H., Altmeyer, P., Kreuter, A. (2008): Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 147 (1): 17-24.
- Gläser, R. (2011): Research in practice: Antimicrobial peptides of the skin. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 9: 1-4.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.-M. (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6: 57–64.
- Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T. (2009) a: The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 129 (3): 641-649.
- Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J.-M., Schwarz, A., Schwarz, T. (2009) b: UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 123 (5): 1117-1123.
- Gort, A. S., Ferber, D. M., Imlay, J. A. (1999): The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32: 179–191.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.-M. (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 387: 861.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.-M. (2001): Isolation and characterization of human  $\beta$ -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276: 5707–5713.

Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T., Gläser, R. (2010): Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J. Invest. Dermatol.* 130 (5): 1355-1364.

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., et al. (2000): Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22: 714–721.

Harder, J., Schröder, J.-M. (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277: 46779–46784.

Harder, J., Schröder, J.-M. (2005): Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J. Leukoc. Biol.* 77: 476–486.

Hata, T. R., Gallo, R. L. (2008): Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 27 (2): 144-150.

Hirsch, J. G. (1956): Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 103 (5): 589-611.

Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V., Gordon, J. I. (2003): Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* 4: 269–273.

Hosaka, Y., Koslowski, M., Nuding, S., Wang, G., Schlee, M., Schäfer, C., Saigenji, K., Stange, E. F., Wehkamp, J. (2008): Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (12): 1151-1158.

Imlay, J. A. (2003): Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 395–418.

Jensen, J.M., Pfeiffer, S., Akaki, T., Schröder, J.-M., Kleine, M., Neumann, C., Proksch, E., Brasch, J. (2007): Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in tinea corporis. *J. Invest. Dermatol.* 127: 1720-1727.

Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J.-M., Harder, J. (2009): RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS One.* 4 (7): e6424.

Krishnakumari, V., Rangaraj, N., Nagaraj, R. (2009): Antifungal Activities of Human Beta-Defensins HBD-1 to HBD-3 and their C-Terminal Analogs Phd1 to Phd3. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53 (1): 256-260.

Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L., et al. (2002): Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 118: 275–281.

Martin, A. G., Kobayashi, G. S. (1993): Fungal diseases with cutaneous involvement. In: Freeberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K., et al., eds. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 2337–2357.

Mineshiba, F., Takashiba, S., Mineshiba, J., Matsuura, K., Kokeyuchi, S., Murayama Y. (2003): Antibacterial activity of synthetic human B defensin-2 against periodontal bacteria. *J. Int. Acad. Periodontol.* 5: 35–40.

Moursi, H., Refai, M. (1968): The effect of hormones on some fungi in vitro. *Mykosen.* 11 (10): 747-754.

Murthy, A. R., Lehrer, R. I., Harwig, S. S., Miyasaki, K. T. (1993): In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J. Immunol.* 151: 6291–6301.

Nishimura, E., Eto, A., Kato, M., Hashizume, S., Imai, S., Nisizawa, T., et al. (2004): Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci. *Curr. Microbiol.* 48: 85–87.

Noble, W. C. (1992): Other cutaneous bacteria. In: *The skin microflora and microbial disease*, p. 210 Noble W. C. (ed.), Cambridge University press, Cambridge.

Norlen, L. (2003): Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin. Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.* 16: 203–211.

Oren, A., Ganz, T., Liu, L., Meerloo, T. (2003): In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp. Mol. Pathol.* 74: 180–182.

Rosenberg, H. F., Domachowske, J. B. (1999): Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol. Res.* 20: 261–274.

Schröder, J.-M. (1999): Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell. Mol. Life. Sci.* 56 (1-2): 32-46.

Schröder, J.-M., Harder, J. (2006): Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63 (4): 469-486.

Singh, P. K., Jia, H. P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B. A., et al. (1998): Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (25): 14961–14966.

Steinman, H. M. (1993): Function of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 175: 1198–1202.

Tomita, T., Hitomi, S., Nagase, T., Matsui, H., Matsuse, T., Kimura, S., et al. (2000): Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol. Immunol.* 44: 749–754.

Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., Edgerton, M. (2007): Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51 (1): 154-161.

Wehkamp, J., Bals, R., Kreft, B., Schröder, J.-M., Stange, E. F. (2007): Angeborene Immunabwehr. *Deutsches Ärzteblatt*. 104 (5): A 257–262.

Weitzman, I., Padhye, A. A. (1996): Dermatophytes: gross and microscopic. *Dermatol. Clin.* 14: 9-22.

Weitzman, I., Summerbell, R. C. (1995): The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 240-259.

Wildfeuer, A., Seidl, H. P. (1995): Comparison of the in vitro activity of fluconazole against *Candida albicans* and dermatophytes. *Arzneimittelforschung*. 45 (7): 819-821.

Yuan, X., Hua, X., Wilhelmus, K. R. (2010): The corneal expression of antimicrobial peptides during experimental fungal keratitis. *Curr. Eye. Res.* 35 (10): 872-879.

Zanger, P., Holzer, J., Schleucher, R., Steffen, H., Schitteck, B., Gabrysch, S. (2009): Constitutive expression of the antimicrobial peptide RNase 7 is associated with *Staphylococcus aureus* infection of the skin. *J. Infect. Dis.* 200 (12): 1907-1915.

Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415 (6870): 389-395.

## 7. Anhang

Pilzart (I)	Pilzart (J)	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p
1	2	0,012	0,020	0,553
	3	-0,005	0,020	0,818
	4	0,059	0,020	0,017*
2	1	-0,012	0,020	0,553
	3	-0,017	0,020	0,417
	4	0,047	0,020	0,044*
3	1	0,005	0,020	0,818
	2	0,017	0,020	0,417
	4	0,064	0,020	0,012*
4	1	-0,059	0,020	0,017*
	2	-0,047	0,020	0,044*
	3	-0,064	0,020	0,012*

**Tabelle 6: Paarweise Vergleiche der Pilzarten. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant, \*\* signifikant, \* moderat signifikant.**

Zeit (I)	Zeit (J)	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	p
1	2	0,028	0,006	0,001***
	3	0,047	0,009	0,001***
	4	0,038	0,007	0,001***
	5	0,043	0,008	0,001***
	6	0,056	0,011	0,001***
	7	0,066	0,016	0,003**
2	1	-0,028	0,006	0,001***
	3	0,019	0,005	0,003**
	4	0,01	0,005	0,09
	5	0,015	0,008	0,103
	6	0,028	0,012	0,053
	7	0,038	0,017	0,053
3	1	-0,047	0,009	0,001***
	2	-0,019	0,005	0,003**

	4	-0,009	0,005	0,116
	5	-0,005	0,008	0,562
	6	0,008	0,012	0,513
	7	0,018	0,016	0,28
4	1	-0,038	0,007	0,001***
	2	-0,01	0,005	0,09
	3	0,009	0,005	0,116
	5	0,004	0,004	0,3
	6	0,017	0,009	0,077
	7	0,027	0,012	0,06
5	1	-0,043	0,008	0,001***
	2	-0,015	0,008	0,103
	3	0,005	0,008	0,562
	4	-0,004	0,004	0,3
	6	0,013	0,005	0,03*
	7	0,023	0,01	0,042*
6	1	-0,056	0,011	0,001***
	2	-0,028	0,012	0,053
	3	-0,008	0,012	0,513
	4	-0,017	0,009	0,077
	5	-0,013	0,005	0,03
	7	0,01	0,006	0,135
7	1	-0,066	0,016	0,003**
	2	-0,038	0,017	0,053
	3	-0,018	0,016	0,28
	4	-0,027	0,012	0,06
	5	-0,023	0,01	0,042*
	6	-0,01	0,006	0,135

**Tabelle 7: Paarweise Vergleiche der Zeitpunkte. Signifikanzniveaus für p: \*\*\* hoch signifikant, \*\* signifikant, \* moderat signifikant.**

Zeit (Tage)	ungehemmtes Wachstum	hBD-2	RNase 7	Psoriasin	Fluconazol
----------------	-------------------------	-------	---------	-----------	------------

1	0,0525	0,0507	0,0545	0,0528	0,0512
2	0,0895	0,0595	0,0658	0,0645	0,0515
3	0,1780	0,1025	0,1132	0,0705	0,0532
4	0,2782	0,2410	0,2643	0,0948	0,0615
5	0,3417	0,3230	0,3428	0,1392	0,0788
6	0,3968	0,3862	0,4023	0,2237	0,1288
7	0,4505	0,4560	0,4655	0,3642	0,2357

**Tabelle 8: Extinktionswerte von *T. rubrum*.**

Zeit (Tage)	ungehemmtes Wachstum	hBD-2	RNase 7	Psoriasin	Fluconazol
1	0,0548	0,0530	0,0585	0,0553	0,0527
2	0,1390	0,0743	0,0727	0,0590	0,0570
3	0,2268	0,1507	0,1367	0,0637	0,0773
4	0,3137	0,2668	0,2660	0,0748	0,1222
5	0,3722	0,3390	0,3540	0,1178	0,1472
6	0,4138	0,3982	0,4257	0,1915	0,1703
7	0,4623	0,4470	0,4938	0,2720	0,1952

**Tabelle 9: Extinktionswerte von *T. mentagrophytes*.**

Zeit (Tage)	ungehemmtes Wachstum	hBD-2	RNase 7	Psoriasin	Fluconazol
1	0,0530	0,0520	0,0563	0,0518	0,0527
2	0,1048	0,0872	0,0875	0,0562	0,0595
3	0,2140	0,1870	0,2013	0,0608	0,0733
4	0,3250	0,3080	0,3357	0,0700	0,1337
5	0,4027	0,3903	0,4125	0,0793	0,1877
6	0,4862	0,4535	0,4678	0,0880	0,2368
7	0,5875	0,5597	0,5312	0,1003	0,2877

**Tabelle 10: Extinktionswerte von *M. canis*.**

Zeit (Tage)	ungehemmtes Wachstum	hBD-2	RNase 7	Psoriasin	Fluconazol
----------------	-------------------------	-------	---------	-----------	------------

1	0,0518	0,0522	0,0555	0,0542	0,0530
2	0,0560	0,0522	0,0555	0,0550	0,0537
3	0,0672	0,0522	0,0562	0,0553	0,0537
4	0,1090	0,0523	0,0565	0,0583	0,0537
5	0,1630	0,0527	0,0568	0,0603	0,0540
6	0,2208	0,0528	0,0568	0,0625	0,0542
7	0,2828	0,0540	0,0568	0,0655	0,0542

**Tabelle 11: Extinktionswerte von *E. floccosum*.**

Pilz	Zeit (Tage)	Mittelwert (Differenz vom ungehemmten Wachstum)	Standardabweichung
1	1	-0,0018	0,0008
1	2	-0,0300	0,0209
1	3	-0,0755	0,0424
1	4	-0,0372	0,0289
1	5	-0,0187	0,0345
1	6	-0,0107	0,0447
1	7	0,0055	0,0678
2	1	-0,0018	0,0021
2	2	-0,0647	0,0295
2	3	-0,0762	0,0422
2	4	-0,0468	0,0211
2	5	-0,0332	0,0078
2	6	-0,0157	0,0098
2	7	-0,0153	0,0142
3	1	-0,0010	0,0026
3	2	-0,0177	0,0189
3	3	-0,0270	0,0296
3	4	-0,0170	0,0272
3	5	-0,0123	0,0271
3	6	-0,0327	0,0292
3	7	-0,0278	0,0111
4	1	0,0003	0,0008

4	2	-0,0038	0,0014
4	3	-0,0150	0,0082
4	4	-0,0567	0,0223
4	5	-0,1103	0,0364
4	6	-0,1680	0,0578
4	7	-0,2288	0,0840

**Tabelle 12: von hBD-2 beeinflusste Extinktionswerte, angegeben als Mittelwerte aus den 3 Patienten und als Differenz vom ungehemmten Wachstum mit Standardabweichung.**

Pilz	Zeit (Tage)	Mittelwert (Differenz vom ungehemmten Wachstum)	Standardabweichung
1	1	0,0020	0,0018
1	2	-0,0237	0,0198
1	3	-0,0648	0,0309
1	4	-0,0138	0,0080
1	5	0,0012	0,0185
1	6	0,0055	0,0266
1	7	0,0150	0,0499
2	1	0,0037	0,0019
2	2	-0,0663	0,0273
2	3	-0,0902	0,0678
2	4	-0,0477	0,0407
2	5	-0,0182	0,0178
2	6	0,0118	0,0081
2	7	0,0315	0,0197
3	1	0,0033	0,0029
3	2	-0,0173	0,0303
3	3	-0,0127	0,0660
3	4	0,0107	0,0684
3	5	0,0098	0,0733
3	6	-0,0183	0,0836
3	7	-0,0563	0,1097
4	1	0,0037	0,0003

4	2	-0,0005	0,0018
4	3	-0,0110	0,0087
4	4	-0,0525	0,0227
4	5	-0,1062	0,0367
4	6	-0,1640	0,0581
4	7	-0,2260	0,0856

**Tabelle 13: von RNase 7 beeinflusste Extinktionswerte, angegeben als Mittelwerte aus den 3 Patienten und als Differenz vom ungehemmten Wachstum mit Standardabweichung.**

Pilz	Zeit (Tage)	Mittelwert (Differenz vom ungehemmten Wachstum)	Standardabweichung
1	1	0,0003	0,0013
1	2	-0,0250	0,0145
1	3	-0,1075	0,0321
1	4	-0,1833	0,0109
1	5	-0,2025	0,0355
1	6	-0,1732	0,0838
1	7	-0,0863	0,1042
2	1	0,0005	0,0009
2	2	-0,0800	0,0124
2	3	-0,1632	0,0156
2	4	-0,2388	0,0270
2	5	-0,2543	0,0569
2	6	-0,2223	0,1140
2	7	-0,1903	0,1704
3	1	-0,0012	0,0031
3	2	-0,0487	0,0206
3	3	-0,1532	0,0444
3	4	-0,2550	0,0564
3	5	-0,3233	0,0634
3	6	-0,3982	0,0765
3	7	-0,4872	0,0998

4	1	0,0023	0,0020
4	2	-0,0010	0,0009
4	3	-0,0118	0,0061
4	4	-0,0507	0,0183
4	5	-0,1027	0,0344
4	6	-0,1583	0,0551
4	7	-0,2173	0,0809

**Tabelle 14: von Psoriasin beeinflusste Extinktionswerte, angegeben als Mittelwerte aus den 3 Patienten und als Differenz vom ungehemmten Wachstum mit Standardabweichung.**

Pilz	Zeit (Tage)	Mittelwert (Differenz vom ungehemmten Wachstum)	Standardabweichung
1	1	-0,0013	0,0008
1	2	-0,0380	0,0228
1	3	-0,1248	0,0431
1	4	-0,2167	0,0355
1	5	-0,2628	0,0433
1	6	-0,2680	0,0725
1	7	-0,2148	0,0981
2	1	-0,0022	0,0015
2	2	-0,0820	0,0142
2	3	-0,1495	0,0338
2	4	-0,1915	0,0797
2	5	-0,2250	0,1043
2	6	-0,2435	0,1323
2	7	-0,2672	0,1627
3	1	-0,0003	0,0008
3	2	-0,0453	0,0145
3	3	-0,1407	0,0343
3	4	-0,1913	0,0214
3	5	-0,2150	0,0265
3	6	-0,2493	0,0328

3	7	-0,2998	0,0386
4	1	0,0012	0,0008
4	2	-0,0023	0,0003
4	3	-0,0135	0,0075
4	4	-0,0553	0,0220
4	5	-0,1090	0,0369
4	6	-0,1667	0,0581
4	7	-0,2287	0,0854

**Tabelle 15: von Fluconazol beeinflusste Extinktionswerte, angegeben als Mittelwerte aus den 3 Patienten und als Differenz vom ungehemmten Wachstum mit Standardabweichung.**

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich dem Direktor der Universitäts-Hautklinik zu Kiel, Herrn Prof. Dr. med. T. Schwarz, für das Ermöglichen dieser Arbeit in den mykologischen Laboren danken.

Herzlich bedanke ich mich auch bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med J. Brasch, für das Anvertrauen des Themas und die großzügige und freundliche Unterstützung in jeder Form bei dessen Ausarbeitung.

Auch den Mitarbeitern der Universitäts-Hautklinik zu Kiel sei an dieser Stelle mein größter Dank ausgesprochen. Insbesondere die liebenswerten MTAs, Frau V. Beck-Jendroschek, Frau A. Preschke und Frau K. Voss, halfen und erklärten, wo sie nur konnten.

Herrn Prof. Dr. J. Harder und Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder, Kiel, danke ich für das zur Verfügung stellen von RNase 7, Psoriasin und Literatur, und Planton GmbH, Kiel, für hBD-2.

Bei der Ausarbeitung der Statistik unterstützte mich Herr Dipl. Inform. J. Hedderich aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. M. Krawczak) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, sowie meine Schwester Susanne, die wenigstens etwas Ordentliches studiert hat und dabei die nötigen statistischen Kenntnisse erworben hat, um mich mit zündenden Ideen zu unterstützen. Danke ebenso für das Korrekturlesen.

Meinen lieben Eltern möchte ich sagen, dass ohne sie nichts von alledem möglich gewesen wäre und dass ich weiß, was ich an ihnen habe.

Zu guter Letzt danke ich meiner süßen Sarah Marie für mehrmaliges Korrekturlesen, endlose Geduld und ein stets offenes Ohr.

## 9. Lebenslauf

Name: Peter Fritz

Geboren: 07.11.1982 in Landsberg am Lech

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Adresse: Clädenstr. 5  
24943 Flensburg

Schulische Bildung:

1988-1993: Grundschule Jarplund-Weding

1993-2002: Altes Gymnasium Flensburg

07.06.2002: Abitur

2002-2003: Grundwehrdienst in Jagel

Studium:

01.04.2004-31.09.2007: Vorklinikstudium der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

01.10.2007-07.12.2009: Klinikstudium der Zahnheilkunde an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

07.12.2009: Staatsexamen mit der Note „gut“

10.12.2009: Approbation als Zahnarzt

01.03.2010-31.03.2011: Anstellung als Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. med. dent. Konrad Feuerhake in Flensburg

Seit 01.04.2011: Anstellung als Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. med. dent. Bent Borg in Flensburg

Seit Februar 2008: Bearbeitung der vorliegenden Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med J. Brasch an der Universitäts-Hautklinik zu Kiel

19.01.2012

Publikation:

Fritz P, Beck-Jendroschek V, Brasch J:

Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides  
human  $\beta$ -defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin.

Medical Mycology in press