

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

**IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS PATHOGEN-
ASSOZIIERTER EPITOPPE IN SUPERFIZIELL MYKOTISCH
INFIZIERTER HAUT (PITYRIASIS VERSICOLOR UND TINEA)**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANKE MÖRIG

aus Böblingen

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Brasch
2. Berichterstatter: PD. Dr. Markus Hoffmann
Tag der mündlichen Prüfung: 15.08.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.08.2014

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

MEINER VERSTORBENEN MUTTER

1 Einleitung	10
1.1 Die Haut.....	10
1.2 Pityriasis versicolor.....	11
1.3 Tinea.....	14
1.4 Rezeptoren.....	17
1.4.1 Toll-like-Rezeptoren.....	17
1.4.1.1 Toll-like-receptor-2.....	18
1.4.1.2 Toll-like-receptor-4.....	18
1.4.1.3 Toll-like-receptor-9.....	19
1.4.2 Dectin-2.....	19
1.5 Abwehrfaktoren.....	20
1.5.1 Defensine.....	20
1.5.1.1 Beta-Defensine.....	21
1.5.1.1.1 Humanes beta-Defensin-2.....	22
1.5.1.1.2 Humanes beta-Defensin-3.....	23
1.5.2 Ribonuklease 7.....	24
1.5.3 Psoriasin.....	25
1.6 Ziel und Fragestellung der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Geräte.....	27
2.2 Chemikalien.....	27
2.3 Lösungen und Puffer.....	27
2.4 Untersuchungsmaterialien.....	28
2.5 Immunhistochemische Methodik.....	28
2.5.1 Färbung.....	28
2.5.2 Immunhistochemische Darstellung von TLR2.....	32
2.5.3 Immunhistochemische Darstellung von TLR4.....	32

2.5.4 Immunhistochemische Darstellung von TLR9.....	32
2.5.5 Immunhistochemische Darstellung von Dectin-2.....	32
2.5.6 Immunhistochemische Darstellung von hBD-2.....	32
2.5.7 Immunhistochemische Darstellung von hBD-3.....	33
2.5.8 Immunhistochemische Darstellung von RNase7.....	33
2.5.9 Immunhistochemische Darstellung von Psoriasin.....	33
2.6 Kontrollen.....	33
2.7 Quantitative Auswertung und Fotodokumentation.....	33
2.8 Statistik.....	34
3 Ergebnisse: Quantitative Auswertung der Färbungen und Vergleich zwischen gesunder Haut und den beiden oberflächlichen Mykosen.....	36
3.1 TLR2.....	36
3.2 TLR4.....	38
3.3 TLR9.....	40
3.4 Dectin-2.....	41
3.5 HBD-2.....	43
3.6 HBD-3.....	44
3.7 RNase7.....	46
3.8 Psoriasin.....	48
4 Diskussion.....	50
4.1 Vergleich der Ergebnisse mit veröffentlichten Befunden.....	51
4.1.1 TLR2.....	51
4.1.2 TLR4.....	53
4.1.3 TLR9.....	55
4.1.4 Dectin-2.....	57
4.1.5 HBD-2.....	57

Inhaltsverzeichnis

4.1.6 HBD-3.....	59
4.1.7 RNase7.....	60
4.1.8 Psoriasin.....	61
4.2 Schlussfolgerungen und Thesen.....	62
4.3 Kritik der Methodik.....	63
5 Zusammenfassung.....	67
6 Literaturverzeichnis.....	69
7 Danksagung.....	83
8 Lebenslauf	84

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AD	atopische Dermatitis
AK	Antikörper
AMP	antimikrobielles Peptid
Aqua dest.	aqua destillata
B-Zellen	bursa-fabricii-Zellen
°C	Grad Celsius
CCR6	Chemokin-Rezeptor-6
CD4+	Cluster-of-Differentiation-4
CD8+	Cluster-of-Differentiation-8
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Chromogen Lösung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii = und andere
<i>e. coli</i>	<i>Escherichea coli</i>
Fa.	Firma
FcRY	Fc-Rezeptor-Y
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hBD	humanes beta-Defensin
hBD-2	humanes beta-Defensin-2
hBD-3	humanes beta-Defensin-3
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
IFN-γ	Interferon-gamma

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
KOH-Mikroskopie	Kaliumlaugen-Mikroskopie
LPS	Lipopolysaccharide
m	Molar
min.	minutes = Minuten
MIP2 α	macrophage-inflammatory-protein-2- α
MIP3 α	macrophage-inflammatory-protein-3- α
μ m	Mikrometer
ml	Milliliter
MyD-88	Myeloid-differentiation-protein-88
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NL	Niederlande
p-Wert	probability-Wert (Signifikanz)
PAMP	Pathogen-associated-molecular-patterns
PGN	Peptidoglycan
PRR	Pattern-Recognition-Receptor
PV	Pityriasis versicolor
RNase	Ribonuklease
SALT	skin-associated-lymphoid-tissue
sek.	Sekunde
Str.	Stratum
T-Zelle	Thymus-Zelle
TBS	Tris-Buffered-Saline (Tris-Phosphat-gepufferte Kochsalz-lösung)
TH1-Zelle	Thymus-Helfer-Zelle 1

Abkürzungsverzeichnis

TLR2	Toll-like-receptor-2
TLR4	Toll-like-receptor-4
TLR9	Toll-like-receptor-9
TNF- α	Tumor-necrosis-factor- α
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
vs.	versus = gegen
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut ist das größte menschliche Organ mit dem unmittelbarsten Kontakt zur Umwelt. Wie andere Organe hat sie verschiedene Aufgaben zu erfüllen. Die Haut regelt unter anderem den Wärmehaushalt, ist ein Kontakt- und Sinnesorgan und grenzt den Organismus von der Umwelt ab. Diese Abgrenzung beinhaltet den Schutz vor äußeren Einwirkungen (Blanco und Garcia 2008), wie zum Beispiel vor Bakterien und Pilzen. Um diese Schutzfunktion wahrnehmen zu können, verfügt die Haut über eine Reihe verschiedener Mechanismen.

So sind Austrocknen der Haut und Schwitzen, ebenso wie eine intakte physikalische und physiologische Barriere, unspezifische Abwehrphänomene. Diese natürliche Barriere besteht aus drei verschiedenen horizontalen Schichten: Epidermis, Dermis und Subcutis. Die Epidermis wiederum besteht von außen nach innen aus dem Stratum corneum, dem Stratum granulosum, dem Stratum spinosum und dem Stratum basale.

Wird das Stratum corneum, welches für eindringende Mikroorganismen aus verschiedenen Gründen eine oft schwer zu bewältigende Hürde darstellt, überwunden, leisten die Zellen des angeborenen Abwehrsystems den Eindringlingen unmittelbar Widerstand (Blanco und Garcia 2008). Die Zellen des Stratum spinosums und die des Stratum corneums gehören neben den Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen zum angeborenen Immunsystem (Pivarcsi et al. 2003). Mastzellen können Wirkstoffe freisetzen, die auf Mikroorganismen einen hemmenden Effekt haben können (Roth und James 1988).

Zusätzlich verfügt die Haut über das sogenannte skin-associated-lymphoid-tissue (SALT). Damit interagieren Keratinozyten, die proinflammatorische Zytokine produzieren können. Diese Zytokine vermitteln Signalmechanismen, die die Abwehrreaktion modulieren. Außerdem gehören Lymphozyten, antigenpräsentierende Langerhanszellen, Thymus-Zellen und Cluster-of-Differentiation-8+Gedächtniszellen (CD8+) dazu (Cove und Eady 1998).

Unterstützt wird das angeborene Immunsystem durch die adaptive Immunantwort. Dies sind Bursa-fabricsii- (B) und Thymus- (T) Lymphozyten, deren Aufgabe die „gezielte Antigenerkennung, die Antikörperproduktion, die Spezifitätserhöhung auf bestimmte Antigene, sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mithilfe von antigenspezifischen Gedächtniszellen ist“ (Blobel 2011).

Weiterhin leben auf der Hautoberfläche viele harmlose kommensale Mikroorganismen. Sie bilden die residente Flora. Diese beinhaltet zum Beispiel Mikrokokken, Corynebakterien und Propionibakterien. Sie sind meistens in den oberen Schichten des Stratum corneums zu finden. Die Zusammensetzung der physiologischen Flora hängt überwiegend vom Wasser- und Nährstoffangebot ab.

1.2 Pityriasis versicolor

Die Pityriasis versicolor (PV) ist eine durch *Malassezia*-Arten (Ghosh et al. 2008) verursachte Mykose (Janaki et al. 1997) der oberflächlichen Hautschichten. In der physiologischen Hautflora sind *Malassezia*-Arten in saprophytärer Form vorhanden, welche sich unter bestimmten Bedingungen in die parasitäre Form umwandelt und chronisch werdende Mykosen verursachen kann.

Bislang ist nicht vollständig geklärt, welche *Malassezia*-Arten beim Menschen Pilzinfektionen auslösen. So ist nach Crespo-Erchiga et al. (2008) und Morishita et al. (2005) *Malassezia globosa* und nach Janaki et al. (1997) *Malassezia furfur* Hauptverursacher der PV.

Die Zellwände von *Malassezia*-Hefen haben einen speziellen Aufbau. So ist ihre mehrschichtige Zellhülle etwa 0,12 µm dick und wird in eine Außenlamelle, eine multilamelläre Wand und eine Plasmamembran untergliedert (Guillot und Guého 1995; Mittag 1994). Diese Zellwand ist mit einem Lipidanteil von 15 % verhältnismäßig fetthaltig, was wahrscheinlich ein Grund für eine hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen ist (Thompson und Colvin 1970). Die Sprossspitze vermehren sich, wie ihr Name sagt, durch monopolare oder sympodiale Sprossung

(Cabañes et al. 2005; Nishimura et al. 1991). Diese Sprosszellen sind rund, oval oder zylindrisch und betragen im Durchmesser etwa 2,5 µm bis 5,0 µm (Guého et al. 1996).



Abbildung 1: Klinisches Bild der PV

PV tritt beim Menschen hauptsächlich an talgdrüsenreichen Arealen des Rumpfes auf. Dabei äußert sie sich klinisch durch kleieförmig schuppende sowohl depigmentierte als auch pigmentierte Läsionen (Abb. 1). Die Farben dieser Makulae reichen von weiß über pink zu braun, was der Pityriasis auch den Beinamen „versicolor“ einbrachte (Crespo-Erchiga et al. 2008). Häufig breiten sich die befallenen Flächen zu großen landkartenartigen Arealen aus. Da von erkrankten Patienten nur selten Juckreiz beklagt wird, ist der ausschlaggebende Grund für einen Arztbesuch die kosmetische Beeinträchtigung durch sichtbare Flächen der Haut (Kamalam und Thambiah 1979).

Vor allem in tropischem Klima auftretend, befällt PV ohne signifikante geschlechtliche Dominanz (Crespo-Erchiga et al. 2008) junge Erwachsene. Dies ist dadurch zu erklären, dass ab der Pubertät die Talgdrüsen wesentlich aktiver werden und *Malassezia*-Arten als lipophile Hefepilze (Gupta et al. 2003) zur Deckung ihres Kohlenstoffbedarfs langkettige Fettsäuren benötigen (Lott et al. 1992), die sich im menschlichen Talg befinden.

1 Einleitung

Histologisch zeichnet sich die PV durch eine Verbreiterung des Stratum corneums (Hyperkeratose) aus. Vereinzelt sind Parakeratosen oder keratotische Plugs zu finden. Das Stratum granulosum und Stratum spinosum sind pathologisch weitgehend unauffällig, während das Stratum basale entweder verschmälert (Janaki et al. 1997) oder verbreitert und pigmentierter erscheint. Gelegentlich fehlt das Stratum granulosum.

Ein interstitielles Infiltrat in der oberen Dermis macht deutlich, dass die *Malassezia*-Hefen fähig sind, wenngleich oft nur schwach (Crespo-Erchiga et al. 2008), das Wirtsabwehrsystem zu aktivieren. Im Infiltrat sind Lymphozyten und Neutrophile zu finden, jedoch keine Monozyten. Wie sich die Immunabwehr des Wirtes im Einzelnen verhält ist bis heute noch nicht endgültig erforscht.

Es besteht Konsens, dass oberflächliche Mykosen in der Lage sind, die Zytokinproduktion zu fördern. Jedoch spielt hierbei auch der Zell-zu-Zell-Kontakt eine wichtige Rolle (Watanabe et al. 2001).

Ungeklärt sind bislang die exogenen und endogenen Prädispositionsfaktoren. Zu den exogenen Faktoren gehören wahrscheinlich erhöhte Luftfeuchtigkeit und eine hohe Außentemperatur, genauso wie luftundurchlässige Kleidung (Hay 1996).

Nach Crespo-Erchiga et al. 2008 sind endogene Aspekte, wie genetische Disposition und erhöhter Kortikosteroidspiegel, mitentscheidend, um an PV zu erkranken. Auch sollen eine hohe Körpertemperatur und Schwitzen Faktoren sein, die zu einer Veränderung des Sebums führen und so die Umwandlung der saprophytären Hefe in ihre pathogene Form unterstützen, was später zum Krankheitsbild der PV führen kann.

Untersuchungen zur Lipidzusammensetzung der Haut bei gesunden und an PV erkrankten Personen haben keine grundlegenden Unterschiede ergeben. Sind Lipidkonzentrationen vereinzelt verändert, wird das dem kommensalen *Malassezia*-Fettstoffwechsel zugeschrieben und besitzt daher pathogenetisch keine weitere Bedeutung (Boardman und Malkinson 1962; Burke 1962).

Untersuchungen zum dermalen Aminosäuregehalt konnten bisher auch nicht zum besseren Verständnis des Übergangs von der harmlosen Hefe zur pathogenen Hyphenform bei *Malassezia* beitragen (Burke 1962).

Die Diagnose der PV erfolgt meist klinisch oder mit Hilfe des Woodlichtes. Im Woodlicht zeigt sich eine gelblich-grüne Fluoreszenz. Bei der klinischen Untersuchung wird mit einem Holzspatel über die betroffenen Stellen gestrichen. Tritt hierbei eine kleieartige Schuppung auf, gilt das ebenfalls als Indiz für eine PV. Charakteristische Pilzelemente lassen sich dann im Kalilaugenpräparat nachweisen.

1.3 Tinea

Dermatophyosen werden im Allgemeinen als Tinea bezeichnet (Flores et al. 2009). Eine Tinea ist eine Hautinfektion, die durch spezialisierte Pilze (Andrews und Burns 2008), die Dermatophyten, hervorgerufen wird. Dermatophyten sind keratinophile Fadenpilze mit den Gattungen *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton*. Die Gattung *Trichophyton* hat die größte humanpathogene Bedeutung. Befallen werden überwiegend Haut, Haare und Nägel, nicht jedoch Schleimhäute (Andrews und Burns 2008). Etwa 20 % der Weltbevölkerung sind von Dermatophyteninfektionen betroffen (Turchin et al. 2005).

Dermatophyten können drei verschiedenen Habitaten zugeordnet werden. Sie sind anthropophil, zoophil und geophil. Die anthropophilen Dermatophyten werden von Mensch zu Mensch übertragen. Die zoophilen, welche von Tieren übertragen werden und die geophilen, die durch auf dem Erdboden lebenden Organismen übertragen werden (Andrews und Burns 2008) rufen beim Menschen stärkere entzündliche Abwehrreaktionen hervor (Hof 2003).

Überwiegend ist der anthropophile Dermatophyt *Trichophyton rubrum* in Deutschland für die oberflächlichen Mykosen beim Menschen verantwortlich (Flores et al. 2009). So verursacht er Tinea corporis und Tinea pedis. Tinea capitis wird durch *Microsporum canis* verursacht. Der Dermatophyt befällt den Haarschaft und macht sich durch Kopfhautjucken klinisch bemerkbar (Andrews und Burns 2008).

Erreger	Wirt	Bemerkung / Vorkommen
<i>Trichophyton rubrum</i>	anthropophil	häufigster humanpathogener Dermatophyt
<i>Trichophyton interdigitale</i>	anthropophil oder zoophil	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	zoophil	
<i>Trichophyton tonsurans</i>	anthropophil	in Amerika und Asien verbreitet
<i>Microsporum canis</i>	zoophil	weltweit häufigster zoophiler Dermatophyt, hohe Kontagiosität, kann auch von Mensch zu Mensch übertragen werden
<i>Microsporum gypseum</i>	geophil	weltweit
<i>Epidermophyton floccosum</i>	anthropophil	kann als einziger humanpathogener Dermatophyt keine Haare befallen
<i>Trichophyton verrucosum</i>	zoophil	Erreger der Kälberflechte
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	anthropophil	klassischer Erreger des Favus („Erbgrind“), charakteristischer Geruch („Mäuseurin“)
<i>Trichophyton violaceum</i>	anthropophil	hauptsächlich im Mittelmeerraum / Afrika / Lateinamerika
<i>Trichophyton soudanense</i>	anthropophil	weltweit
<i>Trichophyton equinum</i>	zoophil	nur selten auf den Menschen übertragen
<i>Microsporum audouinii</i>	anthropophil	nur noch in Afrika zu finden

Tabelle 1: Dermatophyten mit klinischer Manifestation (Tietz und Ulbricht 1999)

Die Konidien der *Trichophyton*-Arten sind keulen- oder gurkenförmig und besitzen glatte, dünne Wände mit bis zu 12 Septen. Die Sporen treten entweder einzeln oder in Clustern auf. Sie weisen eine Größe von 8 – 86 µm auf (Hainer 2003).

Wie sich eine Tinea klinisch äußert hängt unter anderem von der Lokalisation der Infektion ab. So wird zum Beispiel die Tinea pedis von der Tinea corporis unterschieden. Verschiedene klinische Erscheinungsformen sind oberflächlich, wie die vesikuläre (Abb. 2), die hyperkeratotisch-squamöse und die fein-lamellär schuppige Form (Hainer 2003). Derartige Hautläsionen werden „Mokassin“-artige

Infektionen genannt (García-Madrid et al. 2011) und können nicht mehr als rein „kosmetisches Problem“ verstanden werden. Daneben gibt es tiefe Trichophytie-Formen mit Pustelbildung. Tinealäsionen können Eintrittspforten für pathogene Bakterien wie *Streptococcus pyogenes* sein. So können unter Umständen lebensbedrohliche Erysipele entstehen (Roujeau et al. 2004).



Abbildung 2: Klinisches Bild der vesikulären Tinea

Da *Trichophyton rubrum* im Vergleich zu anderen Dermatophyten sehr gut human adaptiert ist und meist im Stratum corneum bleibt, ist dieser Erreger dem Immunsystem und dem Komplementsystem schwer zugänglich (Dahl und Grando 1994). Weiterhin ist anzunehmen, dass dieser Erreger einen Mechanismus entwickelt hat, um die zellvermittelte Immunantwort zu umgehen oder zu unterdrücken (Campos et al. 2006). So hat *Trichophyton rubrum* die Fähigkeit, die Immunantwort zu manipulieren, indem es die Toll-like-receptor-Expression (TLR) und human beta-Defensin-Produktion (hBD) hemmt (García-Madrid et al. 2011). Dies führt dazu, dass gesunde Haut manchmal keine Immunantwort auf *Trichophyton rubrum* zeigt, obwohl der Keim schon jahrelang auf dem menschlichen Körper überlebt (Shiraki et al. 2006). Wenn jedoch eine Abwehrreaktion entsteht, kann sich entweder eine Immunreaktion vom Soforttyp oder vom verspäteten Typ zeigen (Slunt et al. 1996). Bei einer aufflammenden Immunreaktion spielen Zytokine eine wichtige Rolle. Die Mechanismen, die dazu führen, dass eine Zytokinproduktion erhöht wird, sind immer noch weitgehend unklar. Wahrscheinlich erkennen Keratinozyten Pathogene durch verschiedene Rezeptoren unter anderem Toll-like-receptor-2 (TLR2) (Shiraki et al. 2006). Das spätere Zusammenspiel von *Trichophyton rubrum* mit residenten

Makrophagen führt zu der Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-12 (IL-12) (Campos et al. 2006).

Die klinische Diagnose einer Tinea erfolgt meist durch mikroskopischen Erregernachweis, Woodlicht, Pilzkulturen oder Biopsien.

Sowohl exogene als auch endogene Faktoren begünstigen das Entstehen einer Tinea. Zu den endogenen Faktoren gehören z. B. eine beeinträchtigte Mikroflora nach Einnahme von Immunsuppressiva oder Antibiotika ebenso wie Durchblutungsstörungen und Diabetes mellitus. Exogene Prädispositionsfaktoren sind luftundurchlässige Kleidung und dadurch bedingter Feuchtigkeits- und Wärmestau, aber auch der dauerhafte Kontakt mit Chemikalien (Hof 2003).

1.4 Rezeptoren

1.4.1 Toll-like-Rezeptoren

Die TLRs gehören zur Familie des Pattern-Recognition-Receptors, kurz PRR (Kawai et al. 2002). Sie sind Transmembranproteine und Haupterkennungsrezeptoren für pathogenassoziierte Moleküle (Kawai et al. 2002). Das sind für bestimmte Mikroorganismen charakteristische Struktur-moleküle, die auf Oberflächen phagozytierender Zellen dargeboten werden.

TLRs sind maßgeblich an der Aktivierung der angeborenen Immunantwort beteiligt, modulieren aber auch die erworbene Immunantwort (Sumikawa et al. 2006; Villamón et al. 2004).

Ein pathogener Mikroorganismus kann mehrere TLRs und verschiedene Wege der Immunantwort aktivieren. Aus dieser Erkenntnis wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass es Unterschiede der TLRs bei der intrazellulären Signalübermittlung gibt. Die gemeinsame Endstrecke des Signalweges führt durch ein Adaptorprotein, das Myeloid-differentiation-protein-88 (MyD-88), jedoch immer zur Aktivierung von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Takeuchi et al. 1999).

Es wird postuliert, dass TLRs Schlüsselmoleküle für eine effektive Pilzabwehr sind (van der Graaf et al. 2005). So wiesen TLR-Defizit-Mäuse eine bis zu zehnfach höhere Anfälligkeit gegenüber Pilzen auf als ihre Kontrollgruppe (Netea et al. 2002).

1.4.1.1 Toll-like-Rezeptor-2

Der Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2) ist physiologischerweise in normaler Haut präsent (Pivarcsi et al. 2003) und unentbehrlich für die Wirtsabwehr gegen Mikroben, vor allem gegen *Candida albicans* (Villamón et al. 2004). Der Rezeptor erkennt Hyphen (van der Graaf et al. 2005), Hefen und Mykobakterien (Pivarcsi et al. 2003) und wird bei der Endozytose durch Makrophagen zwingend benötigt (Villamón et al. 2004; Jouault et al. 2006). Sein Ligand ist ein Peptidglycan (Kawai et al. 2002), welches Bestandteil grampositiver Bakterien ist (Takeuchi et al. 1999). TLR2 ist der Hauptfaktor bei der Triggerung einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, jedoch nicht ausschließlich dafür verantwortlich (Netea et al. 2002). So reguliert er Tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) und IL-1 β (Netea et al. 2002) und aktiviert NF- κ B (Jouault et al. 2006). Außerdem sorgt er für die Produktion von macrophage-inflammatory-protein-2- α (MIP2 α), einem Chemokin für die Aktivierung und Chemotaxis von Makrophagen (Villamón et al. 2004).

1.4.1.2 Toll-like-Rezeptor-4

Der TLR4 ist, wie TLR2, in normaler Haut vorhanden (Pivarcsi et al. 2003) und an der Wirtsabwehr, z. B. gegen *Candida* beteiligt, wenn auch nicht an deren Phagozytose (Netea et al. 2002). Er induziert eine Thymus-Helfer-Zelle 1 / Cluster-of-Differentiation-4 (TH1/CD4+) abhängige Immunantwort (van der Graaf et al. 2005) und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon-gamma (IFN- γ) und TNF- α (van der Graaf et al. 2005). Außerdem reguliert er die Produktion von MIP2 α , welches für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Villamón et al. 2004). Durch diese beiden Funktionen übernimmt auch TLR4 eine Vermittlerfunktion zwischen angeborener und erworbener Immunantwort.

Seine Liganden sind Lipopolysaccharide. Somit erkennt er vor allem die Außenmembranen gramnegativer Bakterien (Sumikawa et al. 2006).

1.4.1.3 TLR9 Toll-like-Rezeptor-9

TLR9 ist ein spezifischer Rezeptor und kann eine Immunantwort, wahrscheinlich die TH1-Antwort (Eaton-Bassiri et al. 2004), auf gramnegative bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNS) hervorrufen (Bauer et al. 2001; Hemmi et al. 2000). Im Gegensatz zu den anderen TLRs, die auf der Zellmembran lokalisiert sind, herrscht um die Lokalisation von TLR9 noch wissenschaftlicher Disput. So postulieren Eaton-Bassiri et al. 2004, dass TLR9 nur auf der Zelloberfläche exprimiert wird, während Ahmad-Nejad et al. 2002 ihn vor allem intrazellulär auf ruhenden Zellen in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und nicht auf der Zelloberfläche beschreiben. Nach den gerade erwähnten Autoren wird TLR9 erst durch Endozytose aktiviert. Weitere TLR9 exprimierende Zellen sind bursa-fabrics-Zellen, dendritische Zellen und Monozyten oder Makrophagen (Eaton-Bassiri et al. 2004). Die Expression von TLR9 soll mit der Erkennung der bakteriellen DNS korrelieren (Bauer et al. 2001). Die Erkennung von CpG-Dinukleotiden ist streng sequenzspezifisch. TLR9 beschleunigt dann die vesikuläre Aufnahme, die erneute Vesikelordnung und die zelluläre Aktivierung von CpG-Motiven (Takeshita et al. 2001).

1.4.2 Dectin-2

Dectin-2 wurde zum ersten Mal 1999 in einem Mausmodell nachgewiesen (Graham und Brown 2009). Es ist ein Transmembranprotein II (Kanazawa et al. 2004 a), C-Typ-Lectin und sein Gen ist auf dem kurzen Schenkel des 12. Chromosomen lokalisiert. Beim Menschen wurde Dectin-2 vor allem in Lunge, Milz, Lymphknoten, Leukozyten, Knochenmark und Tonsillen entdeckt; besonders häufig in Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen, weniger in Langerhanszellen und peripheren Blutmonozyten (Graham und Brown 2009). In gesunder Haut wurde es kaum nachgewiesen (Kanazawa et al. 2004 b).

Die genaue Funktion von Dectin-2 ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Bewiesen ist, dass es bei der Pilz- und Virenerkennung beteiligt ist und hier als PRR fungiert. Somit hilft es bei der Antigenkruzpräsentation und der Kontrolle der angeborenen Immunantwort (Graham und Brown 2009). Dectin-2 bindet calciumabhängig an die Hyphen, nicht an die Sprosszellen, von *Candida albicans* aber auch von *Trichophytum rubrum* (Sato et al. 2006). Dabei bedient es sich eines FcRY-Rezeptors (Fc-Rezeptor-Y). Dieser Rezeptor bindet an Dectin-2. Die Bindung induziert eine Phosphorylasekettenreaktion, Aktivierung von NF- κ B, Internalisierung eines Ersatzrezeptors und Hochregulation der Sekretion des TNF- α und der IL-1 Rezeptorantagonisten (Sato et al. 2006). Daher wird geschlussfolgert, dass Dectin-2 ein PRR für Pilze ist, der den Signalweg über den FcRY-Rezeptor verwendet, um die angeborene Immunantwort zu induzieren.

1.5 Abwehrfaktoren

1.5.1 Defensine

Sowohl bei Pflanzen, als auch bei Tieren und Menschen, existieren in den Epithelien Peptide mit antimikrobieller Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Hefen und einige behüllte Viren (Schibli et al. 2002): die Defensine. Dies sind kleine kationische Proteine mit einer Länge von 28-42 Aminosäuren (Diamond und Bevins 1998), einem Gewicht von 3-5 kDa (Schibli et al. 2002) und intramolekularen Disulfidbrückenbindungen.

Man unterteilt sie in drei Untergruppen: α -Defensine, β -Defensine und θ -Defensine (Huh et al. 2002). Obwohl diese Gruppen nur geringe Übereinstimmungen in ihrer Primärstruktur und ihrer Oberfläche aufweisen, haben sie eine ähnliche Tertiärstruktur (Diamond und Bevins 1998) und ihre Gene liegen auf dem Chromosom 8p23 (Ganz 2003). Vermutet wird, dass sie sogar vom gleichen Gen abstammen (Diamond und Bevins 1998). α -Defensin kann von Leukozyten und Panethzellen isoliert werden. Von Epithelzellen und Panethzellen kann β -Defensin isoliert und durch inflammatorische Mediatoren induziert werden (Pernet et al. 2003). θ -Defensine wurden bisher nur beim Rhesusaffen aus neutrophilen Granulozyten isoliert (Beisswenger und Bals 2005).

Huh et al. (2002) vermuten, dass Defensine eine Vermittlungsfunktion zwischen angeborener und erworbener Immunantwort einnehmen. So haben sie sowohl auf dendritische Zellen als auch auf Gedächtniszellen eine chemotaktische Wirkung (Schröder und Harder 2006).

1.5.1.1 Beta-Defensine

β -Defensine wurden erstmals in neutrophilen Granulozyten von Rindern entdeckt und unterscheiden sich durch die Lage der Disulfidbrücken von den α - und θ -Defensinen. Sie besitzen eine β -Faltblattstruktur, zwei Exons und zwei Introns (Schneider et al. 2005) und sechs Disulfidbrücken (Ganz 2003). Gesunde Haut produziert in einer sehr geringen Konzentration β -Defensine (Janaki et al. 1997). Wird eine Immunantwort ausgelöst, rekrutieren sie dendritische Zellen (Yang et al. 1999). Ebenfalls fungieren sie als Chemokin für Zellen mit einem Chemokin-Rezeptor-6 (CCR6) (Pernet et al. 2003).

β -Defensine werden hauptsächlich in Epithelzellen von Niere und Lunge exprimiert (Yang et al. 1999). In der Atemluft sind sie unter anderem für den anfänglichen Schutz vor mikrobiologischer Kolonisation verantwortlich (Diamond und Bevins 1998). Dieser Schutzmechanismus funktioniert dadurch, dass Defensine die Bakterien erkennen und Poren in Form von Oligomeren in deren Zytoplasmamembran formen (Harder et al. 1997). Diese gelockerten und zerstörten Membranen sind permeabel für kleinere Moleküle. Ihre intrazelluläre Homöostase ist gestört und sie gehen zugrunde (Ganz 2003).

Es gibt vier β -Defensine. Jedes β -Defensin besetzt eine spezielle Nische im angeborenen Immunsystem (Schibli et al. 2002).

Bei der Regulation der β -Defensine spielt Calcium eine herausragende Rolle (Lu et al. 2006). Es kann die Expression der Defensine induzieren (Pernet et al. 2003). Allerdings können auch Lipopolysaccharide (LPS) und Tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) die Expression erhöhen (Yang et al. 1999).

1.5.1.1.1 Humanes beta-Defensin-2

Humanes beta-Defensin-2 (hBD-2) wurde 1997 (Schröder und Harder 1999) erstmals bei an Psoriasis erkrankten Patienten im Stratum spinosum und Stratum granulosum (Huh et al. 2002) der Epidermis entdeckt. Es ist ein cysteinreiches, 41 Aminosäuren langes Protein (Schneider et al. 2005).

Bei immunhistochemischen Untersuchungen von hBD-2 an Psoriasishaut zeigt das Stratum corneum ein Korbmuster. Wahrscheinlich reichert sich hBD-2 in Interzellularräumen des Stratum corneums an. Zuvor wird es im Stratum granulosum und spinosum produziert (Huh et al. 2002) und dann in den Interzellularraum der Hornschicht ausgeschüttet (Aberg et al. 2008). Bei einer Studie von Liu et al. (2002) war nach Stimulation der Keratinozyten durch IL-1 α , das von ihnen exprimierte hBD-2 nach sechs Tagen aus den suprabasalen Schichten, in denen es vorher zu finden war, verschwunden. Es konnte jetzt vor allem noch im Stratum corneum nachgewiesen werden. Diese Studie zeigt, dass sich hBD-2 besonders im Stratum corneum entzündeter Haut anreichert.

In gesunder Haut kommt hBD-2 kaum vor (Pernet et al. 2003). Ist hBD-2 dennoch in normaler Haut vertreten, dann sehr ungleichmäßig. Vor allem Vorhaut, Trachea, Lunge, deren Alveolarmakrophagen (Diamond und Bevins 1998) und Nieren besitzen vermehrt hBD-2 (Harder et al. 1997).

Da hBD-2 zu den antimikrobiellen Peptiden gehört, erfüllt es Aufgaben der Abwehr. Es wirkt zum Beispiel gegen gramnegative Bakterien (Schröder und Harder 1999) und *Candida albicans* sehr effektiv (Harder et al. 1997), zeigt schwache Aktivität gegen *Trichophyton rubrum* (Jensen et al. 2007), reagiert sofort auf entzündliche Mediatoren wie LPS (Diamond und Bevins 1998) und auf proinflammatorische Cytokine, wie TNF- α und IL-1 β (Schibli et al. 2002). Bei der Immunantwort selber induziert dieses Defensin die Migration von dendritischen Zellen und Gedächtniszellen. Dafür bindet es an einen funktionellen Chemokinrezeptor, den CCR6. Durch diesen Rezeptor ist es außerdem in der Lage, macrophage-inflammatory-protein-3- α (MIP3 α) zu binden (Pernet et al. 2003). MIP3 α ist

wahrscheinlich in Kooperation mit hBD-2 am Erhalt von Langerhanszellen in der normalen Epidermis beteiligt (Pernet et al. 2003).

Bei hoher Salzkonzentration wird die antimikrobielle Aktivität von hBD-2 messbar gehemmt (Schröder und Harder 1999). Proinflammatorische Cytokine stimulieren oft die Produktion von hBD-2. Voraussetzung für die Induktion ist ausdifferenziertes Gewebe. Somit kommt für die Produktion des Defensins die Basalschicht der Epidermis genauso wenig in Frage wie Karzinomgewebe (Schröder und Harder 2006).

Auf transkriptioneller Ebene kann hBD-2 durch den Kontakt mit Mikroorganismen über intrazelluläre Signalwege (Schneider et al. 2005) reguliert werden (Harder et al. 1997). Dieser Weg beinhaltet eine G-Protein gekoppelte Protease und den Nf- κ B-Rezeptor (Schneider et al. 2005). Ähnlich wird auch die hBD-2-Expression geregelt; durch Kontakt mit Mikroorganismen sowie mit Endotoxinen oder proinflammatorischen Cytokinen, wie TNF- α .

1.5.1.1.2 Humanes beta-Defensin-3

HBD-3 wurde ebenfalls zuerst in der Haut von Psoriatikern isoliert. Es ist ein 4 kDa schweres, 67 Aminosäuren langes, basisches Dimer (Schröder und Harder 2006; Schibli et al. 2002). Wie die Gene aller Defensine liegt auch sein Gen auf Chromosom 8 (Schneider et al. 2005).

Physiologischerweise wird hBD-3 nicht nur im Epithel des Gastrointestinal- und Respirationstraktes exprimiert, sondern kommt auch in Leukozyten und im Herz- und Skelettmuskel vor (Schneider et al. 2005). Im Epithel ist es vorzugsweise im Stratum spinosum und den dendritischen Zellen zu finden (Poindexter 2005).

HBD-3 besitzt ebenfalls ein großes antimikrobielles Wirkungsspektrum. Es ist sowohl gegen gramnegative (Harder et al. 2004), wie auch schwach gegen grampositive Bakterien und *Candida albicans* aktiv (Schibli et al. 2002). So wirkt es chemotaktisch auf periphere Blutmonozyten (Pernet et al. 2003).

Die Stimulation von hBD-3 erfolgt, im Gegensatz zu hBD-2, eher durch Interferon-gamma als durch TNF- α . Die Regulation durch TNF- α wird von Pernet et al. (2003) kontrovers diskutiert, wohingegen es Harder et al. (2004) als sicher ansehen, dass TNF- α hBD-3 induziert. Unumstritten ist, dass IL-4 und IL-13 die Induktion mindern (Schröder und Harder 2006).

Die Expression ist durch äußere Reize, wie Bakterienkontakt, stimulierbar (Schneider et al. 2005; Schibli et al. 2002). Der genaue Weg der Stimulationsregulation von hBD-3 ist noch nicht erforscht (Sorensen et al. 2005). Allerdings können bis heute bei hBD-3, wie auch bei hBD-2, mehrere Signalwege für deren Regulation verfolgt werden (Pernet et al. 2003).

1.5.2 Ribonuklease 7

Die humane Ribonuklease 7 (RNase7) gehört zur Superfamilie der Ribonukleasen A (Zhang et al. 2003). Sie hat große Ähnlichkeit mit den bovinen RNasen (Köten et al. 2009) und ist die siebte entdeckte Ribonuklease. Zusammen mit den anderen Ribonukleasen ist ihr Gen auf dem Chromosom 14 lokalisiert (Harder und Schröder 2002). Dieses 28 Aminosäuren große Signalpeptid besitzt ein Zentrum aus zwei Histidin- und einem Lysinrest (Zhang et al. 2003; Harder und Schröder 2002). Sein isoelektrischer Punkt liegt bei 10,5. Somit ist RNase7 atypisch kationisch (Zhang et al. 2003).

Die RNase7 spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr der Haut (Harder und Schröder 2002), wird jedoch auch in anderen Körpergeweben wie Leber, Niere, Skelettmuskel und Herz exprimiert. Seine genaue physiologische Aufgabe ist noch nicht ausreichend erforscht (Köten et al. 2009). Bekannt jedoch ist, dass RNase7 ein großes antimikrobielles Spektrum abdeckt. Sie hindert sowohl das Wachstum von Pilzen als auch von Bakterien, jedoch nicht von Viren (Zhang et al. 2003). Weiterhin erschwert sie methicillin-, genauso wie vancomycinresistenten Bakterien das Eindringen in die Haut (Gläser et al. 2009).

Im Gegensatz zu anderen antimikrobiellen Peptiden (AMPs), wie hBD-2 und hBD-3, ist RNase7 ein konstitutives Peptid. Bei immunhistochemischen Färbungen gesunder Haut ist es in allen Schichten zu finden, besonders aber im Stratum corneum. Dies zeigt, dass Keratozyten der größte RNase7-Lieferant sind (Harder und Schröder 2005; Köten et al. 2009; Gläser et al. 2009). Trotz seiner konstitutiven Expression wird die Expression von RNase7 durch Bakterienkontakt und durch IL-1 β oder IFN- γ noch weiter erhöht (Harder und Schröder 2002).

1.5.3 Psoriasin

Psoriasin gehört zur S100-Gensuperfamilie und besitzt die für diese Genfamilie typische calciumbindende Domäne. Es ist ein aus 101 Aminosäuren bestehendes, 11,4 kDa schweres Peptid (Watson et al. 1998), dessen Gen auf dem Chromosomen 1q21 liegt. Zuerst identifiziert wurde es 1991 von Madsen et al. in Keratinozyten von an Psoriasis erkrankter Haut (Gläser et al. 2009). Mittlerweile ist bekannt, dass es auch in gesunder Epidermis in geringen Mengen vorhanden ist. Hier kommt es vor allem im Talgdrüsenepithel vor (Gläser et al. 2005). In erkrankter Haut wird es sowohl bei Psoriasis als auch bei Plattenepithelkarzinomen der Blase und der Lunge oder hyperproliferativen Krankheiten, wie atopischer Dermatitis stärker exprimiert (Zheng et al. 2008).

Seine genaue biologische Aufgabe ist bisher noch nicht endgültig geklärt (Watson et al. 1998). Jedoch ist bekannt, dass Psoriasin antibakteriell wirkt (Lee und Eckert 2006). Es zeigt schon in geringen Konzentrationen gegen *Escherichia coli* Wirkung. Ob es in höheren Konzentrationen auch gegen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* aktiv ist, ist derzeit noch umstritten (Gläser, et al. 2009; Gläser et al. 2011). Wahrscheinlich kann Psoriasin das Wachstum von Dermatophyten durch die Absonderung von Zink hemmen (Fritz et al. 2012) und ist ein chemotaktischer Faktor, der neutrophile Granulozyten und CD4+T-Lymphozyten stimuliert (Watson et al. 1998). Selber induziert wird es z. B. durch Flagellin, welches ein Bestandteil begeißelter Bakterien ist (Abtin et al. 2008).

1.6 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Sowohl bei Tinea als auch bei Pityriasis versicolor sind die genauen Abwehrmechanismen der Haut nicht endgültig geklärt. Dies ist verwunderlich, da diese die am häufigsten weltweit vorkommenden oberflächlichen Mykosen sind. Bekannt ist, dass normalerweise während der Infektion eine moderate Immunantwort abläuft. Diese Immunantwort ist durch ein geringes Infiltrat von mononukleären Zellen und polymorphen Leukozyten charakterisiert. Obwohl nur wenige dieser Abwehrzellen die obersten Hautschichten erreichen, bleiben die Erreger der oberflächlichen Mykosen auf die obersten Hautschichten begrenzt.

Dies führt zu der Annahme, dass die Abwehr der Haut bei diesen Infektionen nicht-zelluläre Komponenten als wesentliche Faktoren aktiviert.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob bei der Pityriasis versicolor und der oberflächlichen Tinea die beschriebenen Rezeptoren (TLR2, TLR4, TLR9, Dectin-2) und Abwehrfaktoren (hBD-2, hBD-3, RNase7, Psoriasin), an der angeborenen Immunantwort beteiligt sein können.

Dazu wurden immunhistochemische Färbungen für diese Faktoren an läsionaler Haut bei oberflächlicher Tinea, Pityriasis versicolor und gesunder Haut durchgeführt und verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

- SuperFrost®Objektträger (Fa. Menzel GmbH, Braunschweig)
- Mikroskop (Fa. Olympus BH2, Hamburg)
- Deckglas (Fa. Menzel GmbH, Braunschweig)
- Schlittenmikrotom (Fa. Jung AG, Heidelberg)
- Brutschrank (Fa. Heraeus, Wehrheim)
- Umluftofen (Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Plastikküvette (Fa. DAKO, Hamburg)
- Wasserbad (Fa. Köttermann GmbH, Uetze)
- Kamera (Olympus SC 30, Hamburg)

2.2 Chemikalien

- Xylol (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Merck, Darmstadt)
- 3 % H₂O₂ (Merck, Darmstadt)
- Aqua dest. (Fresenius AG, Bad Homburg)
- Mayer's Hämalun (Merck, Darmstadt)
- Glycerin Mounting Medium (Fa. DAKO, Hamburg, Code No. C0563)

2.3 Lösungen und Puffer

- Citratpuffer pH 6,0 aus 0,1 m Natriumcitrat und 0,1 m Zitronensäure (Merck, Darmstadt)
- normales Kaninchen- oder Schweineserum (Fa. DAKO, Hamburg, Code No. X0902/ X0901)
- TBS (Antikörperverdünnungspuffer) = Tris buffered saline; Tris Base 6 g, NaCl 8,8 g auf 1000 ml, 37 %ige HCl (alles von Merck, Darmstadt)
- biotinylated swine-anti rabbit immunglobulin (Fa. DAKO, Hamburg, Code No. E353) verdünnt 1:600

- biotinylated rabbit-anti mouse immunglobulin (Fa. DAKO, Hamburg, Code No. E354) verdünnt 1:250
- biotinylated rabbit-anti goat immunglobulin (Fa. DAKO, Hamburg, Code No. E0466) verdünnt 1:600
- streptABComplex/HRP (Fa. DAKO, Hamburg, Code No. K0377)
- Peroxidase-Substrat Lösung DAB (BioGenex, NL)
- Ethanol 100 %, 96 %, 70 % (Merck, Darmstadt) durch Verdünnung mit Aqua dest. auf die entsprechende Konzentration eingestellt
- Peroxidase-Substrat-Lösung DAB (BioGenex, NL)

2.4 Untersuchungsmaterialien

Es wurden insgesamt 27 humane Hautbiopsien untersucht. Diese verteilten sich folgendermaßen: 9 Präparate von oberflächlicher Tinea durch *Trichophyton rubrum*, 8 Präparate von oberflächlicher Tinea ohne bekannten Erreger und 10 Präparate von Pityriasis versicolor. Zusätzlich wurden zum Vergleich durchschnittlich 10 Schnitte von gesunder Haut und sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen angefertigt. Die Präparate gesunder Haut wurden aus Randgebieten exzidierter benigner Melanozytennävi angefertigt. Die Nävi wurden vom Stamm sonst gesunder Patienten entnommen. Die Präparate stammen alle aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel. Sie wurden im Zeitraum von 2002 bis 2008 entnommen, routinemäßig fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.5 Immunhistochemische Methodik

2.5.1 Färbung

Um die Schnitte für die Färbungen vorzubereiten, wurde die ABC-Methode angewandt. Sie funktioniert durch die starke Affinität von Biotin zu Avidin (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Paraffin eingebettete

2 Material und Methoden

Hautbiopsien aus dem histologischen Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des UKSH, Campus Kiel verarbeitet. Mit einem Schlittenmikrotom wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden diese bei 40° C im Wasserbad entfaltet, auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und über Nacht im Umluftofen bei 37 °C getrocknet. Dies dient dazu, das vom Gewebe aufgenommene Wasser wieder zu entfernen. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert, indem sie zwei mal fünf Minuten in Xylol getaucht wurden. Daraufhin folgte das Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe mit 100 %, 96 % und 70 %. Die Schnitte wurden kurz zweimal in Aqua dest. getaucht. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu vermindern, wird die intrazelluläre Peroxidase inhibiert. Dafür wurden die Gewebesektionen 5 min. in einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert. Durch zweimaliges Waschen der Objektträger in Aqua dest. wurde anschließend die überschüssige Wasserstoffperoxid-Lösung entfernt. Nachdem die Präparate 30 min. bei 90 °C in 10 m Citratpuffer erhitzt worden waren, wurden sie 30 min. im Puffer bei Raumtemperatur abgekühlt, kurz in Aqua dest. und anschließend 5 min. in TBS gespült. Danach wurden die Präparate für 30 min. in normalem Kaninchen- oder Schweineserum (DAKO Code No. X 0901/ X0902 Diagnostica Hamburg) inkubiert, um den nicht-spezifischen Hintergrund zu blockieren. Das restliche Serum wurde entfernt und die Schnitte für 30 min. mit dem ersten Antikörper, der mit TBS verdünnt war (jeweilige Antikörperverdünnung in TBS, siehe Tabelle 2), inkubiert. Es wurden Antikörper gegen TLR2, TLR4, TLR9, Dectin-2, hBD-2, hBD-3 RNase7 und Psoriasin verwendet.

Ligand des Antikörpers	Art	Spezies	Firma / Bestellnummer	Verdünnung
Toll-like-receptor-2	polyklonal	Kaninchen	Abcam ab24192	1: 500
Toll-like-receptor-4	polyklonal	Kaninchen	Abcam ab47093	1:100
Toll-like-receptor-9	polyklonal	Ziege	Abcam ab53396	1: 250
Dectin-2	polyklonal	Kaninchen	Novus biologicals NBP1-03472	1: 75

2 Material und Methoden

humanes β-Defensin-2	polyklonal	Ziege	Preprotech	1:500
humanes β-Defensin-3	polyklonal	Kaninchen	Preprotech	1:500
RNase7	polyklonal	Ziege	von Dr. rer. nat. Lange (Institut für Experimentelle Chirurgie, UKSH, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt	1:400
Psoriasin	monoklonal	Maus	von Prof. Gläser (Klinik für Dermatologie, Neurologie und Allergologie des UKSH, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt	1:20000

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Serum	Firma / Bestellnummer
streptABComplex / HRP bestehend aus: Reagenz A: Streptavidin Reagenz B: biotinylierte Meerrettich- Peroxidase	DAKO K0377
Normal swine serum	DAKO X 0901
Normal rabbit serum	DAKO X0902
Rabbit anti-Goat Immunglobulin/ Biotinylated	DAKO E0466

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Seren

2 Material und Methoden

Nach Entfernung des überschüssigen primären Antikörpers durch Spülen in TBS wurden die Schnitte für 30 min. mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (biotinylated rabbit-anti mouse, DAKO code No. E 354/ biotinylated swine-anti rabbit immunglobulins, DAKO Code No. E 353/ biotinylated rabbit-anti goat DAKO Code No. E 0466, Diagnostica Hamburg) beschichtet. Nach einer weiteren Reinigung in TBS wurde der StreptABComplex für 30 min. auf die Präparate gegeben. Die Farbreaktion erfolgte schließlich nach erneutem Waschen in TBS durch die Peroxidase-Substrat-Lösung DAB (3,3'-Diaminobenzidin Chromogen Lösung, BioGenex, NL) nach Angaben des Herstellers. Nach Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun-Lösung wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gespült, in Leitungswasser für 10 min. gebläut und abschließend mit Glycerringel eingedeckelt (DAKO Code No. C0563).

Arbeitsschritt	Zeit
Blockieren der endogenen Peroxidase (3 % H ₂ O ₂)	5 min.
Spülen in Aqua dest.	
Kochen in Citratpuffer	30 min.
Abkühlen im Puffer	30 min.
Spülen in Aqua dest.	
Spülen in TBS	5 min.
Inkubation mit normalem Schweineserum / Kaninchenserum	30 min.
Serum entfernen	
Inkubation mit Primärantikörper	30 / 60 min.
Spülen mit TBS	3 x 5 min.
Inkubation mit Sekundärantikörper	30 min.
Inkubation mit StreptABComplex / HRP	30 min.
Spülen in TBS	3 x 5 min.
Inkubation mit Peroxidase-Substrat-Lösung (DAB)	5 – 15 min.

Abspülen des DAB mit Aqua dest.	
Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun	5 – 10 sek.
Bläuen unter fließendem Leitungswasser	10 min.
Eindeckeln mit Glyceringel Mounting Medium	

Tabelle 4: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung

2.5.2 Immunhistochemische Darstellung von TLR2

Der polyklonale Antikörper gegen TLR2 wurde in der Konzentration 1:500 mit dem Antikörper (AK)-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde TLR2 für 60 Minuten.

2.5.3 Immunhistochemische Darstellung von TLR4

Der polyklonale Antikörper gegen TLR4 wurde in der Konzentration 1:600 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde TLR4 für 60 Minuten.

2.5.4 Immunhistochemische Darstellung von TLR9

Der polyklonale Antikörper gegen TLR9 wurde in der Konzentration 1:250 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde TLR9 für 60 Minuten.

2.5.5 Immunhistochemische Darstellung von Dectin-2

Der polyklonale Antikörper gegen Dectin-2 wurde in der Konzentration 1:75 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde Dectin-2 für 60 Minuten.

2.5.6 Immunhistochemische Darstellung von hBD-2

Der polyklonale Antikörper gegen hBD-2 wurde in der Konzentration 1:500 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde hBD-2 für 60 Minuten.

2.5.7 Immunhistochemische Darstellung von hBD-3

Der polyklonale Antikörper gegen hBD-3 wurde in der Konzentration 1:500 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde hBD-3 für 30 Minuten.

2.5.8 Immunhistochemische Darstellung von RNase7

Der polyklonale Antikörper gegen RNase7 wurde in der Konzentration 1:400 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde RNase7 für 60 Minuten.

2.5.9 Immunhistochemische Darstellung von Psoriasisin

Der polyklonale Antikörper gegen Psoriasisin wurde in der Konzentration 1:20000 mit dem AK-Verdünnungspuffer verdünnt. Inkubiert wurde Psoriasisin für 60 Minuten.

2.6 Kontrollen

Zum Vergleich wurden parallel von Biopsien gesunder Haut entsprechender Lokalisationen Kontrollen angefertigt. Diese wurden mit den Tinea- und Pityriasis versicolor-Gruppen verglichen. Die Kontrollen stammen ebenfalls aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des UKSH, Campus Kiel. Es wurde zu allen Antikörperfärbungen auch jeweils mindestens eine positive Kontrolle angefertigt. Als Positivkontrollen dienten Hautschnitte von Psoriasispatienten. Ebenso wurde mindestens jeweils eine Negativkontrolle gefärbt. Dabei wurden die jeweiligen Antikörperfärbungen ohne den ersten Antikörper durchgeführt.

2.7 Quantitative Auswertung und Fotodokumentation

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Mikroskopes der Fa. Olympus BH2, Hamburg bei 20-facher Vergrößerung ausgewertet. Dafür wurde die Epidermis separat in vier Schichten beurteilt: Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Ob in einer Schicht eine für den jeweiligen Antikörper typische

Färbung auftrat, wurde durch eine Ja-/ Nein-Entscheidung bewertet. Nur eine deutlich sichtbare Färbung wurde als positiv gewertet. Zusätzlich wurde die Dermis in ihrer Gesamtheit betrachtet und in ihrer Anfärbung bewertet.

Die Positivkontrollen zeigten eine deutliche Färbung, wohingegen die Negativkontrollen keine sichtbare Färbung aufwiesen.

Da sich für die beiden Tineagruppen bei den ersten Auswertungen der Präparate unter dem Mikroskop keine relevanten Unterschiede ergaben, wurden die beiden Tineagruppen (Tinea durch *Trichophyton rubrum* und Tinea ohne bekannten Dermatophyten) zu einer Tineagruppe zusammengefasst. Die Präparate wurden in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe beinhaltete alle Tineapräparate, die zweite Gruppe die Pityriasis versicolor und die dritte Gruppe die gesunde Haut.

2.8 Statistik

Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und dem Institut für Statistik und Epidemiologie der TU-München.

Der Färbevergleich der Gruppen hinsichtlich des Anteils gefärbter Hautschichten wurde zuerst mit Hilfe von Wilson Konfidenzintervallen (Wilson 1927) dargestellt, wobei das Konfidenzniveau 95 % betrug. Diese Konfidenzintervalle schätzten die Färbewahrscheinlichkeiten der Anteile der gefärbten Präparate in der jeweiligen Stichprobe. Prozentwerte wurden auf die erste Dezimalstelle gerundet. Beim anschließenden Gruppenvergleich – verglichen wurde Tinea versus gesunde Haut (Gruppe 1), Tinea versus Pityriasis versicolor (Gruppe 2) und gesunde Haut versus Pityriasis versicolor (Gruppe 3) – wurde zur Überprüfung der Unabhängigkeit der Ergebnisse der globale Fisher Exakt Test, welcher auch bei geringen Fallzahlen zuverlässige Resultate liefert, durchgeführt. Die statistischen Auswertungen erfolgten jeweils zu einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 5 %. Resultierende p-Werte aus paarweisen post-hoc Gruppenvergleichen wurden nach der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (Holm 1979). Somit war eine Aussage für $p < 0,05$

signifikant. Durch dieses Vorgehen konnten die drei untersuchten Gruppen paarweise verglichen werden. Ergab sich für einen Gruppenvergleich $p < 0,05$, unterschied sich das Färbeverhalten zwischen diesen Gruppen signifikant. Wichtiger als der p-Wert nur leicht von $p < 0,05$ ab, wurde im Text eine Tendenz beschrieben.

Die statistischen Analysen wurden mit der Software R Version 2.12.2 und WolframAlpha durchgeführt („The R Project for Statistical Computing“ 2013, Wilson score interval calculator - Wolfram|Alpha). Die Grafiken wurden ebenfalls mit Hilfe dieses Programmes erstellt. Die Darstellung der Ergebnisse der Färbungsvergleiche erfolgte anhand von Fehlerbalkendiagrammen. In diesen Darstellungen wurde jeweils der beobachtete Anteilswert gefärbter Zellen in den Vergleichsgruppen mit dem korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall nach Wilson präsentiert.

3 Ergebnisse: Quantitative Auswertung der Färbungen und paarweiser Vergleich zwischen gesunder Haut und den beiden oberflächlichen Mykosen

Nachdem die Immunfärbungen in jeder Gruppe für sich ausgewertet wurden, sollten sie im Folgenden untereinander vergleichend dargestellt und untersucht werden.

3.1 TLR2

Für TLR2 war im Stratum corneum bei Tinea (Abb. 3) in 10,5 %, im Stratum granulosum in 21,1 %, im Stratum spinosum und basale in 73,7 % der Fälle eine Färbung sichtbar. In der Dermis konnte keine positive Immunreaktion nachgewiesen werden.

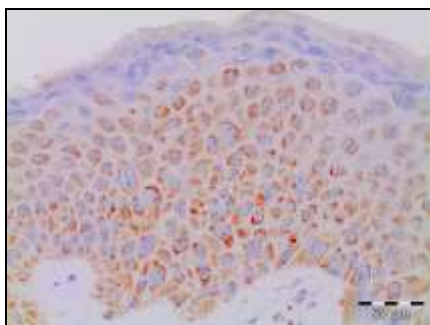


Abbildung 3: Immunfärbung durch TLR2 bei Tinea durch *T. rubrum*; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

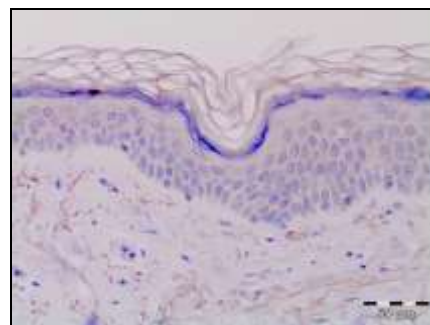


Abbildung 4: Immunfärbung durch TLR2 bei gesunder Haut; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

Bei Pityriasis versicolor (PV) war im Stratum corneum keine Anfärbbarkeit erkennbar. Im Stratum granulosum, Stratum spinosum und basale wurden 10,0 % der Präparate angefärbt. In der Dermis ließ sich in 30,0 % der Fälle eine Färbung nachweisen.

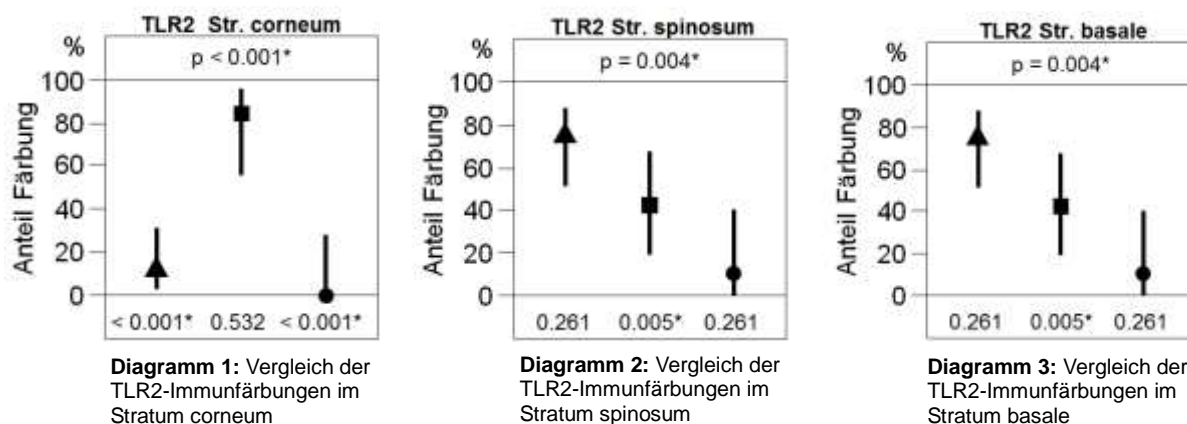
Gesunde Haut (Abb. 4) wies bei dieser Antikörperfärbung im Stratum corneum bei 83,3 % der Präparate eine Anfärbung auf. Etwa in der Hälfte der Fälle (41,7 %) zeigten das Stratum spinosum und basale eine Immunreaktion. Im Stratum granulosum konnten nur noch in 25,0 % eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden und in der Dermis wurde keine Antikörperreaktionen beobachtet.

3 Ergebnisse

Bei den Färbungen für TLR2 ergaben sich insgesamt unerwartete Ergebnisse. Es konnten sowohl für das Stratum corneum (Diagramm 1; $p < 0,001$) als auch für das Stratum spinosum (Diagramm 2; $p = 0,004$) und das Stratum basale (Diagramm 3; $p = 0,004$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen gezeigt werden.

Im Stratum corneum waren die Präparate der gesunden Haut jeweils signifikant häufiger gefärbt als die der Tinea ($p < 0,001$) und die der Pityriasis versicolor ($p < 0,001$).

Dagegen waren im Stratum spinosum und im Stratum basale die Schnitte der Tinea ($p = 0,005$) im Vergleich zu denen der Pityriasis versicolor statistisch signifikant häufiger gefärbt. In der Dermis ($p = 0,065$) und im Stratum granulosum ($p = 0,779$) konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der untersuchten Gruppen beobachtet werden.



▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 1 bis 3: Die Fehlerbalkendiagramme zeigen Expressionsunterschiede der TLR2-Immunfärbungen innerhalb des Stratum corneums, des Stratum spinosums und des Stratum basales. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte Wert gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

3.2 TLR4

Tineapräparate (Abb. 5) konnten im Stratum corneum zu 52,9 % angefärbt werden. 70,6 % der Präparate wiesen eine Färbung im Stratum granulosum, 82,4 % im Stratum spinosum und 70,6 % im Stratum basale auf. Lediglich in der Dermis war keine Immunreaktion zu sehen.

Die PV (Abb. 6) konnte im Stratum granulosum zu 50,0 %, im Stratum spinosum zu 60,0 % und im Stratum basale zu 30,0 % angefärbt werden. Das Stratum corneum wies, wie die Dermis, keine immunhistochemische Anfärbbarkeit auf.

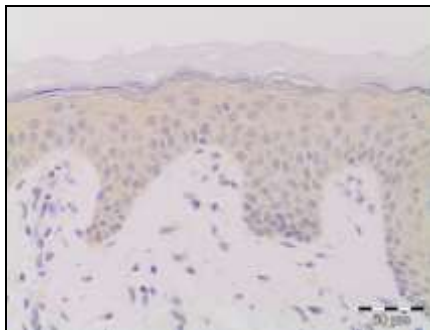


Abbildung 5: Immunfärbung durch TLR4 bei Tinea durch unbekanntem Erreger; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.

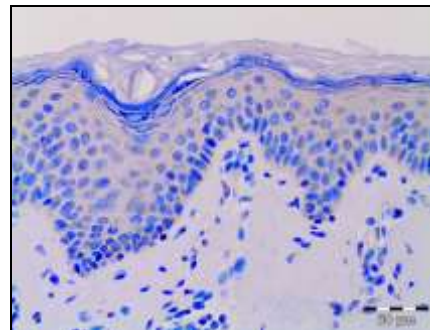


Abbildung 6: Immunfärbung durch TLR4 bei Pityriasis versicolor; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.

In den Schnitten gesunder Haut zeigte das Stratum corneum eine Färbung in 45,5 %. Das Stratum granulosum, das Stratum spinosum sowie das Stratum basale ließen eine Anfärbbarkeit von 36,4 % erkennen. Die Dermis war in keinem der Hautpräparate für diesen Antikörper anfärbbar.

Zur TLR4-Expression lässt sich sagen, dass sich im Stratum corneum (Diagramm 4; $p=0,012$) die Tineapräparate signifikant häufiger anfärben lassen, als die der PV ($p=0,027$).

In den anderen Hautschichten sind keine Signifikanzen erkennbar, jedoch zeichnet sich im Stratum spinosum (Diagramm 5; $p=0,052$) ein Trend ab. Hier sind die Tineapräparate im Vergleich zur gesunden Haut tendenziell häufiger gefärbt ($p=0,061$).

3 Ergebnisse

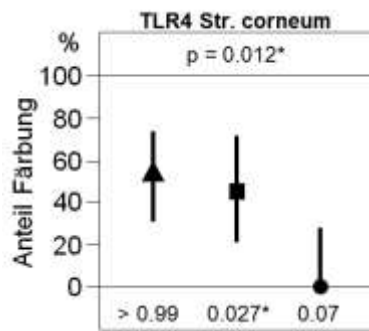


Diagramm 4: Vergleich der TLR4-Immunfärbungen im Stratum corneum

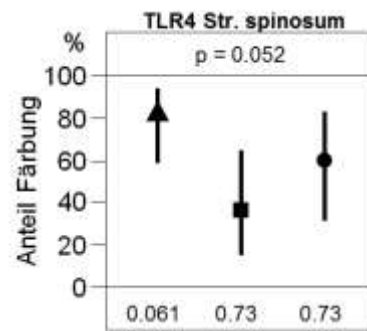


Diagramm 5: Vergleich der TLR4-Immunfärbungen im Stratum spinosum

▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 4 und 5: Die Fehlerbalkendiagramme zeigen Expressionsunterschiede der TLR4-Immunfärbungen innerhalb des Stratum corneums und des Stratum spinosums. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

3.3 TLR9

TLR9 konnte bei den Tineapräparaten (Abb. 7) in 17,6 % im Stratum corneum, in 35,3 % im Stratum granulosum, in 70,6 % im Stratum spinosum und in 29,4 % im Stratum basale nachgewiesen werden. In der Dermis war keine Färbung sichtbar.

Bei der PV (Abb. 8) konnte TLR9 in 100,0 % im Stratum corneum, in 30,0 % im Stratum granulosum und in 20,0 % im Stratum spinosum dargestellt werden. Im Stratum basale und in der Dermis war keine Färbung erkennbar.

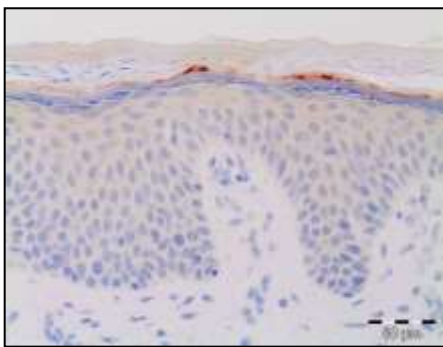


Abbildung 7: Immunfärbung durch TLR9 bei Tinea durch *T. rubrum* Erreger typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 μm .

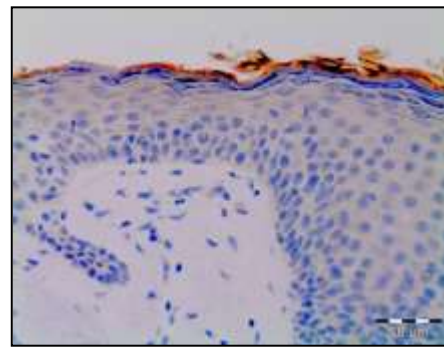


Abbildung 8: Immunfärbung durch TLR9 bei PV; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 μm .

Präparate gesunder Haut waren bis zur Dermis anfärbbar. So konnten das Stratum corneum in 66,7 %, das Stratum granulosum und basale in 33,3 % angefärbt werden. Während sich das Stratum spinosum in 41,7 % anfärben ließ, war in der Dermis keine Anfärbbarkeit zu erkennen.

Bei den Immunfärbungen zu TLR9 ergaben sich folgende statistisch signifikante Unterschiede: Im Vergleich der Tinea zur PV war die Tinea im Stratum corneum (Diagramm 6; $p < 0,001$) statistisch signifikant weniger häufig ($p < 0,001$) gefärbt. Des Weiteren war gesunde Haut im Vergleich zur Tinea ($p = 0,035$) häufiger gefärbt.

Im Stratum spinosum (Diagramm 7; $p = 0,032$) konnte bei der Tinea im Vergleich zur PV ($p = 0,055$) folgende Tendenz beobachtet werden: Tinea ließ sich häufiger anfärben als PV.

3 Ergebnisse

Im Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale und in der Dermis konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden.

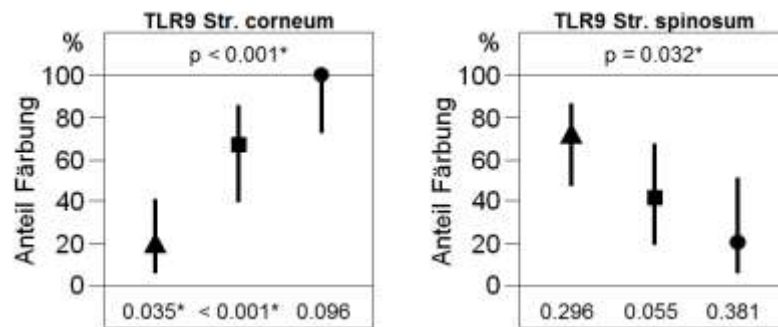


Diagramm 6: Vergleich der TLR9-Immunfärbungen im Stratum corneum

Diagramm 7: Vergleich der TLR- Immunfärbungen im Stratum spinosum

▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 6 und 7: Die Fehlerbalkendiagramme zeigen Expressionsunterschiede der TLR9-Immunfärbungen innerhalb des Stratum corneums und des Stratum spinosums. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

3.4 Dectin-2

Bei der Tinea (Abb. 9) ließ sich in 88,9 % Dectin-2 im Stratum corneum, in 72,2 % im Stratum granulosum, in 83,3 % im Stratum spinosum und in 44,4 % im Stratum basale nachweisen. In der Dermis war keine Immunreaktion zu erkennen.

Bei PV (Abb. 10) konnte eine zur Tiefe hin abnehmende Anfärbbarkeit verzeichnet werden. Positiv waren 90,0 % der Präparate im Stratum corneum, 60,0 % im Stratum granulosum und 50,0 % im Stratum spinosum. Eine immunhistochemische Färbung lag im Stratum basale bei 40,0 % vor und war in der Dermis negativ.

3 Ergebnisse

Normale Haut konnte im Stratum corneum in 90,0 %, sowohl im Stratum granulosum als auch im Stratum spinosum und im Stratum basale in 60,0 % angefärbt werden. Lediglich die Dermis ließ keine Anfärbbarkeit erkennen.

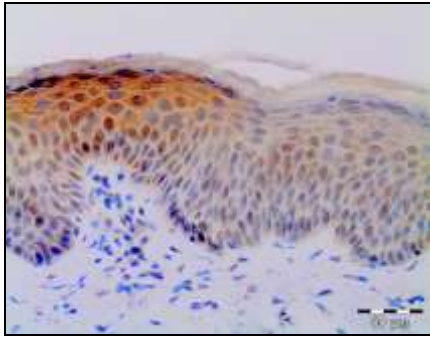


Abbildung 9: Immunfärbung durch Dectin-2 bei Tinea durch *T. rubrum* Erreger; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 μm .

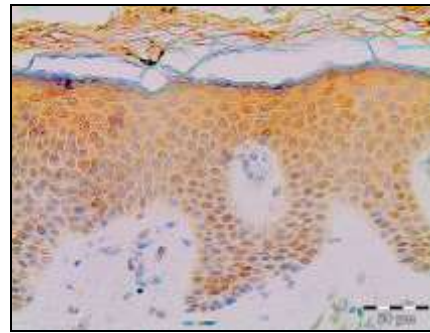


Abbildung 10: Immunfärbung durch Dectin-2 bei PV; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 μm .

Insgesamt lassen sich bei den Färbungen zu Dectin-2 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mykosen und gesunder Haut erkennen. Die Präparate der PV sind im Vergleich zu den Tineapräparaten ähnlich gefärbt, genauso wie die jeweilige oberflächliche Mykose im Vergleich zur gesunden Haut.

3.5 HBD-2

Tineapräparate (Abb. 11) zeigten sowohl im Stratum corneum als auch im Stratum granulosum mit 82,4 % eine sehr hohe Anfärberate. Im Stratum spinosum konnte mit 47,1 % eine geringere Färbungsquote aufgezeigt werden, wohingegen das Stratum basale und die Dermis keine erkennbare Immunfärbung aufwiesen.

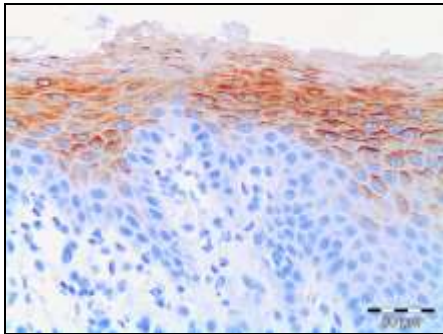


Abbildung 11: Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Immunfärbung durch hBD-2 bei Tinea durch unbekanntes Erreger; aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstab balken beträgt 50 μm .

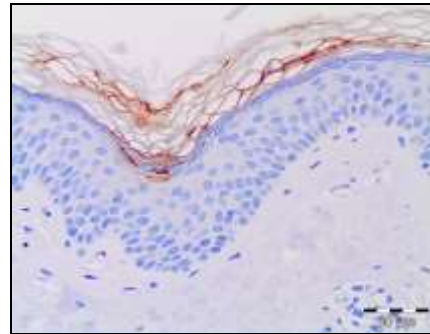


Abbildung 12: Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Immunfärbung durch hBD-2 bei PV; aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstab balken beträgt 50 μm .

Das Stratum corneum war bei PV (Abb. 12) in allen Präparaten angefärbt (100,0 %) und das Stratum granulosum noch bei 30,0 % der Präparate. Unterhalb des Stratum spinosums war keine Färbung mehr sichtbar genauso wenig wie in der Dermis.

Wie in Abb. 11 ersichtlich, ist hBD-2 bei Tinea bis in das Stratum spinosum und bei PV (Abb. 12) bis ins Stratum granulosum nachzuweisen. In gesunder Haut ist keine Expression sichtbar.

Im Stratum corneum (Diagramm 8; $p < 0,001$) waren sowohl die Tineapräparate ($p = 0,001$) als auch die Hautproben der PV ($p < 0,001$) im Vergleich zur gesunden Haut statistisch signifikant häufiger gefärbt.

Tinea zeigte im Stratum granulosum (Diagramm 9; $p < 0,001$) im Vergleich zur gesunden Haut ($p = 0,001$) ebenfalls eine statistisch signifikant häufigere Färbung. Ebenfalls konnte Tinea ($p = 0,025$) im Vergleich zur PV häufiger angefärbt werden.

3 Ergebnisse

Im Stratum spinosum (Diagramm 10; $p=0,005$) wurden die Tineapräparate im Vergleich zur PV signifikant häufiger angefärbt ($p=0,036$).

Somit bestehen im Stratum basale ($p>0,99$) und in der Dermis ($p>0,99$) keine signifikanten Unterschiede im Färbevergleich zwischen den Mykosen und der gesunden Haut.

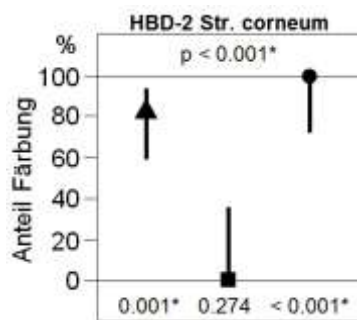


Diagramm 8: Vergleich der hBD-2-Immunfärbungen im Stratum corneum

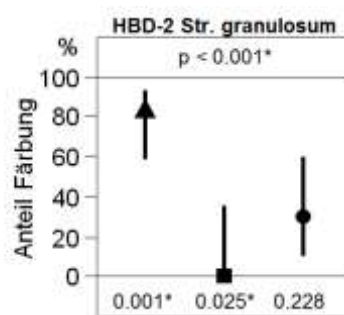


Diagramm 9: Vergleich der hBD-2 Immunfärbungen im Stratum granulosum

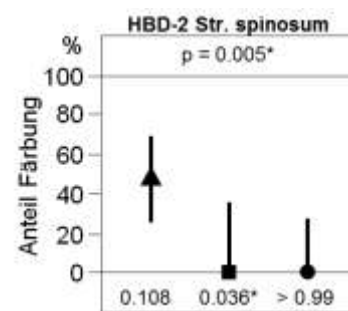


Diagramm 10: Vergleich der hBD-2-Immunfärbungen im Stratum spinosum

▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 8 bis 10: Die Fehlerbalkendiagramme zeigen Expressionsunterschiede der hBD-2-Immunfärbungen innerhalb des Stratum corneums, des Stratum granulosums und des Stratum spinosums. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p<0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

3.6 HBD-3

HBD-3 war bei Tineahautschnitten (Abb. 13) zu 94,1 % im Stratum corneum, zu 41,2 % im Stratum granulosum und zu 5,9 % im Stratum spinosum nachzuweisen. Im Stratum basale und der Dermis konnten keine Färbungen dokumentiert werden.

Die PV (Abb. 14) zeigte in den zwei obersten Hautschichten eine positive Immunfärbung. So konnten im Stratum corneum 100,0 % der Fälle und im Stratum

3 Ergebnisse

granulosum 20,0 % der Fälle eine Anfärbbarkeit verzeichnen. Vom Stratum spinosum bis zur Dermis waren keine Färbungen darzustellen.

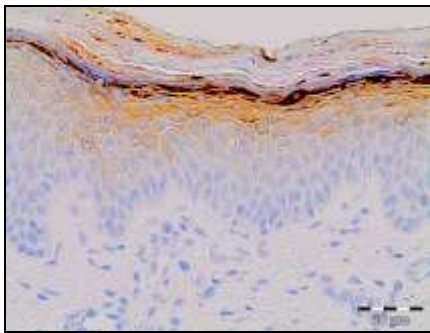


Abbildung 13: Immunfärbung durch hBD-3 bei Tinea durch *T.rubrum* Erreger; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstab balken beträgt 50 µm.

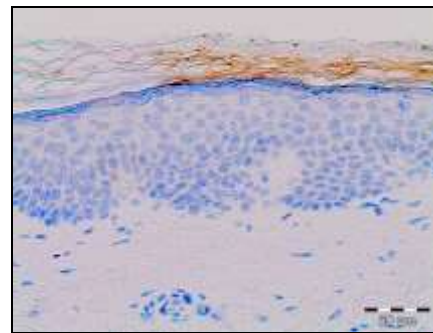


Abbildung 14: Immunfärbung durch hBD-3 bei PV; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstab balken beträgt 50 µm.

Bei Präparaten gesunder Haut konnte in der obersten Hautschicht eine Färbung beobachtet werden. Diese betrug im Stratum corneum 40,0 %. Unterhalb des Stratum corneums war keine positive Immunreaktion sichtbar.

Bei der hBD-3-Expression konnten nur für das Stratum corneum (Diagramm 11; $p=0,001$) statistisch signifikante Unterschiede beobachtet werden. In diesem Stratum wurden sowohl die Tineapräparate ($p=0,012$) als auch die der PV ($p=0,022$) signifikant häufiger im Vergleich zur gesunden Haut angefärbt.

Im Stratum granulosum zeigte sich folgende Färbetendenz, die jedoch statistisch nicht signifikant (Diagramm 12; $p=0,054$) war: So waren die Tineapräparate ($p=0,078$) im Vergleich zur gesunden Haut, bei der keine Farbreaktion beobachtet werden konnte, tendenziell häufiger gefärbt.

In den anderen Hautschichten ist gesunde Haut im Vergleich zu beiden oberflächlichen Mykosen weniger oft gefärbt, jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse bei PV sind tendenziell mit denen der Tinea vergleichbar und zeigen somit keine signifikanten Unterschiede im Färbevergleich der Mykosen und der gesunden Haut.

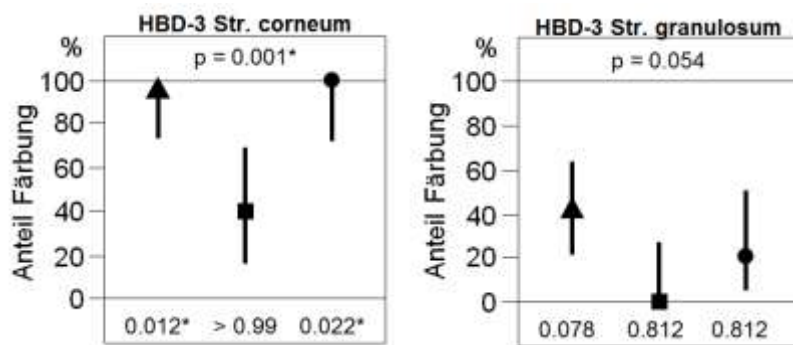


Diagramm 11: Vergleich der hBD-3-Immunfärbungen im Stratum corneum

Diagramm 12: Vergleich der hBD-3-Immunfärbungen im Stratum granulosum

▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 11 und 12: Die Fehlerbalkendiagramme zeigen Expressionsunterschiede der hBD-3-Immunfärbungen innerhalb des Stratum corneums und des Stratum granulosums. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

3.7 RNase7

RNase7 war bei 100,0 % der Tineapräparaten (Abb. 15) im Stratum corneum und bei 94,1 % im Stratum granulosum nachzuweisen. Jedoch war keine Färbbarkeit im Stratum spinosum, Stratum basale und in der Dermis zu dokumentieren.

PV (Abb. 16) ließ in 100,0 % eine Anfärbbarkeit im Stratum corneum und noch in 50,0 % im Stratum granulosum erkennen, während in den anderen Hautschichten keine positive Reaktion dargestellt werden konnte.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei gesunder Haut. Hier waren positive Farbreaktionen im Stratum corneum in 92,9 % und im Stratum granulosum in 21,4 % zu verzeichnen. Das Stratum spinosum, Stratum basale und die Dermis wiesen keine Immunreaktion auf.

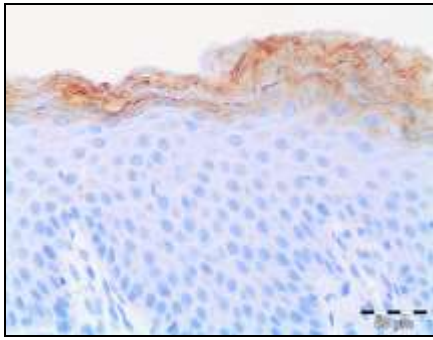


Abbildung 15: Immunfärbung durch RNase7 bei Tinea durch unbekanntes Erreger; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 µm.

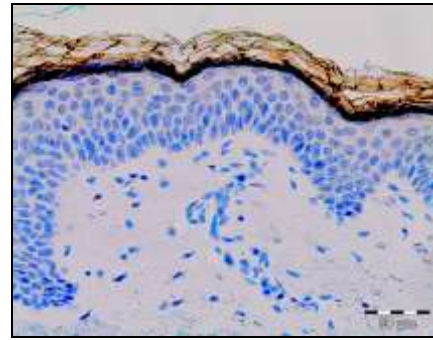


Abbildung 16: Immunfärbung durch RNase7 bei PV; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 µm.

In dieser Antikörperfärbung waren lediglich im Stratum granulosum (Diagramm 13; $p < 0,001$) statistisch signifikante Unterschiede erkennbar. Tineapräparate zeigten sowohl im Vergleich mit gesunder Haut ($p < 0,001$) als auch im Vergleich mit PV ($p = 0,03$) statistisch signifikant häufigere Färbung. Weder im Stratum corneum und im Stratum spinosum noch im Stratum basale und in der Dermis waren weitere statistisch signifikante Unterschiede erkennbar.

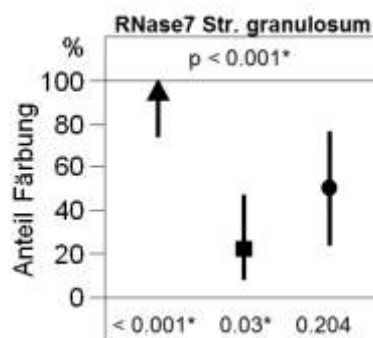


Diagramm 13: Vergleich der RNase7-Immunfärbungen im Stratum granulosum

▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 13: Das Fehlerbalkendiagramm zeigt Expressionsunterschiede der Rnase7-Immunfärbungen innerhalb des Stratum granulosums. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

3.8 Psoriasisin

Tineapräparate (Abb. 17) zeigten im Stratum corneum, im Stratum granulosum und im Stratum spinosum eine hohe Anfärberate. So ließ sich das Stratum corneum in 88,2 %, das Stratum granulosum in 100,0 % und das Stratum spinosum in 76,5 % anfärben. Das Stratum basale und die Dermis ließen keine immunhistochemische Färbung erkennen.

Bei der PV (Abb. 18) war Psoriasisin in 100,0 % im Stratum corneum, in 90,0 % im Stratum granulosum und in 80,0 % im Stratum spinosum zu finden. Stratum basale und Dermis waren frei von Psoriasisin.

Bei gesunder Haut konnte das Stratum corneum in 36,4 % angefärbt werden, während das Stratum granulosum, Stratum spinosum und das Stratum basale keine Färbung aufwiesen. Jedoch zeigte sich in der Dermis wiederum eine Farbreaktion in 18,2 % der Fälle.

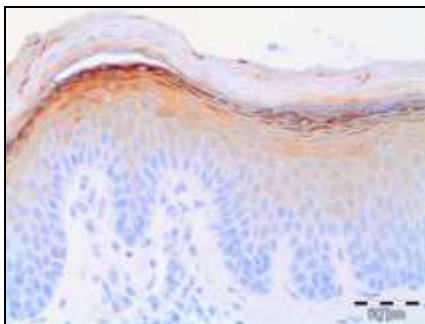


Abbildung 17: Immunfärbung durch Psoriasisin bei Tinea durch *T.rubrum* Erreger; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 µm.

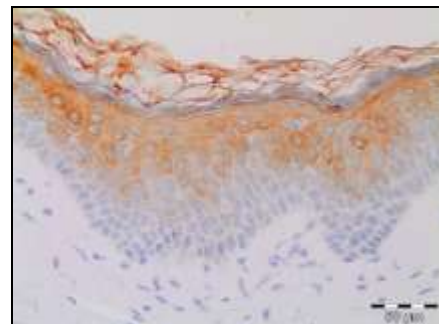


Abbildung 18: Immunfärbung durch Psoriasisin bei PV; typisches Beispiel aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken beträgt 50 µm.

Bei den Färbungen zu Psoriasisin zeigten lediglich das Stratum basale ($p=0,263$) und die Dermis ($p=0,142$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Färbungen der Mykosen und der gesunden Haut. Die anderen drei Hautschichten ließen alle statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen erkennen.

So war im Stratum corneum (Diagramm 14; $p=0,001$) gesunde Haut sowohl im

3 Ergebnisse

Vergleich mit den Tineapräparaten ($p=0,021$) als auch mit PV ($p=0,012$) statistisch signifikant weniger häufig gefärbt.

Dieselbe Aussage konnte für das Stratum granulosum (Diagramm 15; $p<0,001$) gemacht werden. Auch hier ließ sich gesunde Haut im Vergleich zu beiden oberflächlichen Mykosen (Tinea: $p<0,001$ und PV: $p<0,001$) signifikant weniger häufig anfärben.

Im Stratum spinosum (Diagramm 16; $p<0,001$) ließ sich gesunde Haut sowohl im Vergleich zu Tinea ($p<0,001$) als auch im Vergleich zur PV ($p<0,001$) signifikant weniger häufig anfärben.

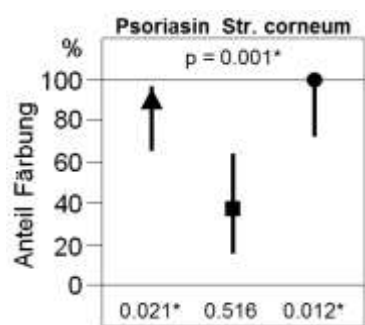


Diagramm 14: Vergleich der Psoriasin-Immunfärbungen im Stratum corneum

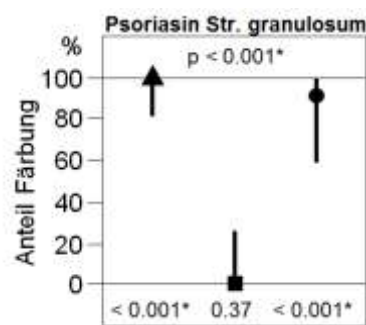


Diagramm 15: Vergleich der Psoriasin-Immunfärbungen im Stratum granulosum

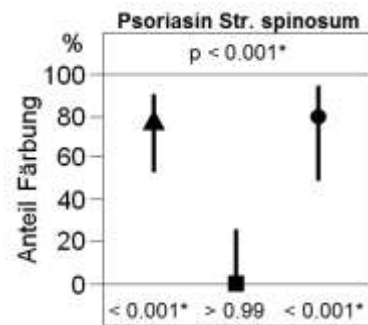


Diagramm 16: Vergleich der Psoriasin-Immunfärbungen im Stratum spinosum

▲ = Tinea ● = Pityriasis versicolor ■ = gesunde Haut

Diagramme 14 bis 16: Die Fehlerbalkendiagramme zeigen Expressionsunterschiede der Psoriasin-Immunfärbungen innerhalb des Stratum corneums, des Stratum granulosums und des Stratum spinosums. Der prozentuale Anteil positiver Färbung wird in den Vergleichsgruppen im korrespondierenden 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Der Diagrammwert oben zeigt den p-Wert, ermittelt mit dem globalen Fisher Exakt Test. Die Diagrammwerte unten zeigen p-Werte, ermittelt mit dem paarweise post-hoc Fisher Exakt Test, adjustiert nach der Methode von Holm. Der erste Wert vergleicht Tinea mit gesunder Haut, der zweite Tinea mit Pityriasis versicolor und der dritte gesunde Haut mit Pityriasis versicolor. Signifikanzen ($p<0,05$) wurden mit einem Stern versehen.

4 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Annahme zu prüfen, ob bestimmte an der antimikrobiellen Abwehr beteiligte Liganden und Abwehrfaktoren bei der superfiziellen Tinea und Pityriasis versicolor eine Rolle spielen könnten.

Bislang wurde die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren und Rezeptoren hauptsächlich in gesunder Haut, bei Psoriasis und atopischer Dermatitis (AD) untersucht. Diese Krankheiten sind zwar beide chronisch entzündlich, jedoch nicht durch mikrobielle Erreger ausgelöst. Die AD wird meist durch eine TH2-Zellen vermittelte Reaktion charakterisiert, dagegen wird die Immunantwort von Psoriasis vornehmlich von TH1-Zellen vermittelt (Braun-Falco et al. 2005). Beide werden folglich von der spezifischen Immunantwort beherrscht.

Lediglich die Arbeiten von Jarrousse et al. (2006) und García-Madrid et al. (2011), vergleichen die Expression einiger von uns untersuchter Antikörper in pilzinfizierter Haut mit gesunder Haut. Jarrousse et al. (2006) untersuchten die Expressionen von TLR2, TLR4 und TLR9 unter anderem in mykotischen Hauterkrankungen. Diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass bei Hautmykosen die Expression der erwähnten Rezeptoren in der Epidermis stark zunimmt. Garcia-Madrid et al. (2011) vergleichen unter anderem die Expression von TLR2, TLR4 und hBD-2 in der Haut von Tineapatienten mit der in gesunder Haut. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass in der Haut von Tineapatienten die Expression von TLR2 und TLR4 sowie die hBD-2-Produktion ansteigt.

Eine systematische Studie zur Beteiligung der von uns untersuchten Komponenten an der natürlichen Abwehr bei superfiziellen Mykosen wurde noch nicht publiziert. Somit ist ein Vergleich zu korrelierenden klinischen Studien bisher nicht möglich. Bei Tinea und PV existiert offensichtlich eine Aktivierung der unspezifischen Hautabwehr. Es tritt eine erhöhte Expression antimikrobieller Peptide und Signalmoleküle auf. Wahrscheinlich werden die in dieser retropektiven Studie untersuchten Liganden und antimikrobiellen Peptide von den mykotischen Infektionen getriggert.

4.1 Vergleich der Ergebnisse mit veröffentlichten Befunden

4.1.1 TLR2

TLR2 ist auch in gesunder Epidermis zu finden. Seine Konzentration unterscheidet sich dort laut de Koning et al. (2010) und Baker et al. (2003) nicht signifikant zu der in erkrankter Haut. Die Arbeitsgruppe von Baker et al. (2003) fand heraus, dass die Keratinozyten in normaler Haut TLR2 konstitutiv exprimieren und Curry et al. (2003) entdeckten, dass TLR2 schwach im Stratum basale exprimiert wird. In der Dermis gesunder Haut ist TLR2 jedoch laut Kim et al. (2010) nicht nachweisbar.

Eine weitere interessante Studie von Kim et al. (2006), die an Säuglingen und Föten mit Chorioamnionitis die TLR2-Expression untersuchten, zeigte, dass die TLR2-Expression bei diesen Patienten ab dem Stratum basale bis zu den oberflächlichen Hautschichten deutlich erhöht war. Sie entdeckten auch TLR2 in der Dermis, im Kapillarendothel und in den Haarfollikeln.

Unsere Ergebnisse decken sich nahezu mit denen der Studien von Kim et al. (2006) und von Curry et al. (2003). In Übereinstimmung mit der zuletzt genannten Studiengruppe wies auch bei uns das Stratum corneum gesunder Haut die häufigste TLR2-Expression auf. Somit wird die Aussage unterstützt, dass TLR2 konstitutiv im Stratum corneum exprimiert wird. Diese Hautschicht ist bei den superfiziellen Hautmykosen meist lädiert und exprimiert weniger TLR2. Es muss jedoch auch die nicht ganz eindeutige Auswertbarkeit der TLR-Färbungen im Stratum corneum zur Diskussion gestellt werden. Es war bei den Auswertungen teilweise nicht einwandfrei zu beurteilen, ob das Stratum corneum antikörperbedingt angefärbt ist oder nicht, so dass dieses Ergebnis unsicher ist.

Tineapräparate wiesen im Stratum spinosum und im Stratum basale eine signifikant häufigere Färbung auf als die der PV. Ebenfalls ist bei der TLR2-Expression ein Expressionswechsel von den oberen gesunden Epidermisschichten zu den tieferen Schichten in infizierter Haut festzustellen. Hieraus könnte geschlossen werden, dass sich bezüglich TLR2 die Abwehr der beiden superfiziellen Mykosen unterscheidet. Erklärt würde dies dadurch, dass TLRs, besonders TLR2, auf den Keratinozyten und

4 Diskussion

Monozyten für *Trichophyton rubrum* Rezeptoren darstellen, die diesen Dermatophyten erkennen und so eine Immunreaktion auslösen. Im Infiltrat von PV fehlen solche Monozyten. In gesunder Haut fehlt ein solches Infiltrat gänzlich. Gleiches gilt für das Stratum basale. *Trichophyton rubrum* ist ein Erreger der Tinea während die PV durch *Malassezia*-Arten ausgelöst wird. Dies mag auch erklären, dass bei den Präparaten der PV eine geringere Konzentration von TLR2 vorhanden ist. Eine zweite Begründung der häufigeren Expression von TLR2 in Tineapräparaten mag in der höheren Invasivität der Tinea liegen.

Diese signifikant häufigere Anfärbbarkeit des Stratum spinosum und Stratum basale bei Tineapräparaten unterstützt die Vermutung, dass TLR2 in der Immunabwehr für Tinea ein Schlüsselmolekül in der Epidermis ist.

Wie bereits bei den einzelnen Antikörpern beschrieben, setzt die Abwehrfunktion durch die TLRs eine Kaskade in Gang.

In Abbildung 19 ist ersichtlich, dass die Bindungsdomänen der TLRs bestimmte molekulare Strukturen, die für Pathogene charakteristisch sind, erkennen. Dies sind Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated-molecular-patterns, PAMPs). Im Wirtsorganismus sind diese Pattern nur selten vorhanden. TLR2 erkennt vor allem die in grampositiven Bakterien und Pilzen vorkommenden Lipopeptide.

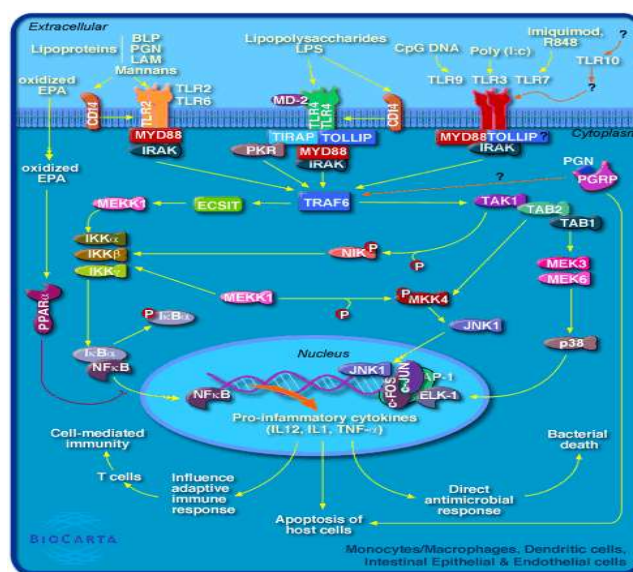


Abbildung 19: TLR-Kaskade

Da TLR2 hauptsächlich in der äußeren Zellmembran von zahlreichen Immunzellen wie Monozyten und dendritischen Zellen lokalisiert ist, ist die Interaktion mit extrazellulären Erregern oder Toxinen über diese Liganden leicht möglich. Nach Bindung der PAMPs an die TLRs beginnt die Signalkaskade und es kommt zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Zelldifferenzierung und -proliferation, aber auch Apoptose, können eingeleitet werden. Bislang ist die Produktion verschiedener Effektormoleküle im Immunsystem am besten untersucht. Diese Effektormoleküle können zum einen direkt toxisch auf Pathogene einwirken. Zum anderen locken Chemokine weitere Immunzellen an. Bestimmte Zytokine bewirken gezielt die Aktivierung und Reifung von Zellen der erworbenen Immunantwort, von B- und T-Lymphozyten und dadurch die Produktion von Antikörpern. Durch die Lokalisation der TLRs auf den Monozyten wird die angeborene Immunabwehr aktiviert. Somit übernehmen die TLRs eine Vermittlungsfunktion zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr (Kierner 2012).

Durch die TLR2-Reaktion und die Verknüpfung der beiden Immunantworten kann *Trichophyton rubrum* effektiver überwunden werden.

4.1.2 TLR4

Die Studienlage zur Expression von TLR4 in gesunder und erkrankter Haut ist recht übersichtlich.

Bewiesen ist bis heute, dass TLR4 in normaler Epidermis präsent ist (Pivarcsi et al. 2003). In welchen Hautschichten der Antikörper immunhistochemisch sichtbar gemacht werden kann, ist bisher nur von Curry et al. (2003) und Blobel (2011) untersucht worden. Curry et al. (2003) beschrieben TLR4 vor allem fokal auf der Plasmamembran der Keratinozyten im mittleren Stratum spinosum und keine Expression auf den basalen Keratinozyten und den Langerhanszellen. Eine starke und diffuse Expression fanden sie auf den dendritischen Zellen der Dermis. Dagegen wies Blobel (2011) in einer Studie nach, dass TLR4 bei Normalhaut vor allem im

Stratum basale vertreten ist. In den anderen Hautschichten konnte jedoch auch TLR4 sichtbar gemacht werden.

In ihrer Studie verglichen Curry et al. (2003) die TLR4-Expression gesunder Haut mit der Expression in Psoriasis-Haut. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass in an Psoriasis erkrankter Haut eine erhöhte Anzahl mononukleärer Zellen in der Epidermis und dendritischer Zellen in der Dermis zu finden sind, die vermehrt TLR4 exprimieren. Im Stratum basale soll bei Psoriasis-Haut kein TLR4 zu finden sein.

Ku et al. (2008) stellten die Expression von TLR4 in gesunder Haut der Expression in atopischer Dermatitis gegenüber und fanden heraus, dass in atopischer Dermatitis nur sehr schwach TLR4 in der Epidermis exprimiert wird.

Unsere Ergebnisse stimmen weitestgehend mit denen von Curry et al. (2003) überein. So konnten wir bei beiden untersuchten superfiziellen Mykosen eine TLR4-Expression in den mittleren Epidermisschichten nachweisen. Dagegen konnte keine positive Färbung in der Dermis gesunder Haut beobachtet werden.

Dass Färbungen des Stratum corneums in den Schnitten von PV im Vergleich zu Tinea signifikant seltener sind, lässt vermuten, dass PV das Stratum corneum ohne Aktivierung der Immunantwort überwunden hat. Hierfür gibt es zwei mögliche Gründe. Entweder ist die epidermale Barriere, vor allem das Stratum corneum, derart geschädigt, dass keine TLR4-Reaktion stattfinden kann oder der Erreger hat die oberste Hautschicht ohne TLR4-Reaktion penetriert. Beides sind jedoch Vermutungen und die geringen ausgewerteten Fallzahlen relativieren diese Interpretation. Des Weiteren kommt hinzu, dass das Stratum corneum bei den TLR-Färbungen nicht immer eindeutig zu beurteilen war. Bei einer positiven Bewertung kann eine unspezifische Färbung des Stratum corneums nicht immer sicher ausgeschlossen werden.

Bei beiden superfiziellen Mykosen, Tinea und PV, kommt es zu einer Störung der epidermalen Barriere. Immunreaktionen treten daher in den mittleren epidermalen Schichten begünstigt auf. Dies bestätigen die immunhistochemischen Färbungen für

TLR4. Normalerweise erkennt TLR4 LPS. Vermutet werden kann, dass TLR4 auch durch andere Lipide aktiviert werden kann. Diese Lipide könnten Stoffwechselprodukte der superfiziellen Mykosen sein. Durch diese Stoffwechselprodukte aktiviert, beeinflusst TLR4 die spezifische Abwehr und rekrutiert über MIP2 α neutrophile Granulozyten, welche die angeborene Abwehr beeinflussen. TLR4 nimmt wie TLR2 eine Vermittlerfunktion zwischen beiden Immunantworten ein.

4.1.3 TLR9

Über die Lokalisation von TLR9 in gesunder Haut herrscht bisher noch Disput. So postulieren Ku et al. (2008), dass der Rezeptor in geringem Maße im Stratum basale und im unteren Stratum spinosum zu finden ist, jedoch sind Curry et al. (2003) der Meinung, dass TLR9 gar nicht in Dermis und Epidermis gesunder Haut exprimiert wird. Auch über die Lage des Rezeptors in Bezug auf die Zelle selbst herrscht Uneinigkeit. Eaton-Bassiri et al. fanden 2004 heraus, dass der Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dagegen sind Ahmad-Nejad et al. (2002) der Meinung, dass er intrazellulär vorkommt und nicht auf der Oberfläche.

Die Arbeit von Ku et al. (2008) untersuchte ebenfalls die Expression von TLR9 in gesunder Haut und verglich sie mit Psoriasis-Haut und atopischer Dermatitis. Sie kamen zu folgenden Ergebnissen: Die Expression in entzündeter Haut ist niedriger als in gesunder Haut; in atopischer Dermatitis ist nahezu keine, in der gesamten Psoriasis-Haut keine Expression vorhanden.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von Ku et al. (2008) in der Aussage überein, dass wir in gesunder Haut in allen Schichten bis zum Stratum basale TLR9 nachweisen konnten. Jedoch konnte ihre Aussage, dass die Expression von TLR9 in entzündeter Haut weniger markant ist als in gesunder Haut, nur bezüglich der Tinea im Stratum corneum bestätigt werden. So zeigen unsere anderen an superfiziellen Mykosen erhobenen Daten vielmehr oft mindestens genauso häufig eine Färbung wie in gesunder Haut oder sogar öfter. Dies war nach den Ergebnissen der oben genannten Arbeitsgruppe nicht zu erwarten, passt aber zu den Befunden von Bauer

et al. (2001), die postulieren, dass die TLR9-Expression mit der Erkennung der bakteriellen DNS korrespondieren soll. Dies mag bei fungaler DNS ähnlich sein, sollten deren CpG-Dinukleotide übereinstimmen.

Unterstützt werden kann dies durch die Aussage, dass durch die TLR9-Expression eine Signalkaskade über den My88-Weg in Gang gesetzt wird und somit die angeborene Abwehr bei entzündlichen Hautkrankheiten aktiviert wird. Ebenso ist TLR9 in der Lage, eine spezifische Immunantwort hervorzurufen. So könnte eine gesteigerte Expression von TLR9 in den Schnitten der superfiziellen Mykosen erklärt werden.

Auch die Aussage von Curry et al. (2003), dass in gesunder Haut kein TLR9 vorhanden ist, kann durch unsere Arbeit nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass in den gesunden Hautschnitten TLR9 in allen Epidermisschichten vorhanden ist.

Im Stratum corneum unterscheiden sich die beiden superfiziellen Mykosen signifikant in ihren Anfärbbarkeiten. Es ist in den Präparaten der PV signifikant häufiger angefärbt als bei Tinea. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression von TLR9 im Stratum corneum stärker durch Malassezia-Arten aktiviert wird als durch Dermatophyten.

Zur Abwehrfunktion von TLR9 besagt eine weitere Studie, dass TLR9 zwar ein konstitutiv aktiver Rezeptor ist, jedoch nicht unbedingt benötigt wird, um einen konstanten basalen Schutz vor Mikroorganismen zu bieten, noch um eine effiziente Immunantwort auszulösen (Narbonne-Reveau et al. 2011).

Aus dieser Studie und unseren Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Expression von TLR9 nicht spezifisch für die untersuchten oberflächlichen Mykosen und eine Beteiligung von TLR9 an der Immunantwort fraglich ist. Es muss auch hierzu relativiert werden, dass die Färbung des Stratum corneums, bei TLR9 genauso wie bei TLR2 und TLR4, schwierig auszuwerten war, so dass eine unspezifische Färbung nicht fehlerfrei von einer spezifischen zu unterscheiden war.

4.1.4 Dectin-2

Zur Expression von Dectin-2 in gesunder und erkrankter Haut ist die bisherige Studienlage sehr dürftig und in sich widersprüchlich. Ariizumi et al. (2000) fanden heraus, dass Dectin-2 konstitutiv in der Epidermis exprimiert wird, wobei die größte Konzentration in den residenten dendritischen Zellen, den Langerhanszellen (Aragane et al. 2003) zu liegen scheint.

Konträr zu dieser Aussage postulieren Kanazawa et al. (2004 a), dass gesunde menschliche Haut insgesamt negativ für die Dectin-2-Expression ist. Vergleichende Studien zu atopischer Dermatitis und Psoriasis sind bisher nicht bekannt.

Unsere Studie kann, in Bezug auf gesunde Haut, die Ergebnisse von Ariizumi et al. (2000) bestätigen. In gesunder Haut ist Dectin-2 in allen Hautschichten vertreten, somit sehr wahrscheinlich ein konstitutives Protein. Begründet werden kann dies durch die Aufgabe von Dectin-2. Es ist ein PRR. Es erkennt calciumabhängig Pathogene und unterstützt die Kontrolle und Aktivierung der Kaskade der angeborenen Immunantwort. Dectin-2 ist in der Lage, die Hyphen von *Trichophyton rubrum* zu erkennen und an diese zu binden. Es ist anzunehmen, dass auch *Malassezia*-Arten von Dectin-2 erkannt werden. Die Erkennung der Hyphen und Bindung über einen FcRY-Rezeptor an z. B. dendritische Zellen ist entscheidend für die Antigenkruzpräsentation und darauffolgende Sekretion der proinflammatorischen Cytokine wie TNF- α (Criado et al. 2011). Wäre Dectin-2 in gesunder Haut nicht vorhanden, könnte es seiner Aufgabe beim Signalweg zur Induktion der angeborenen Immunantwort nicht nachkommen. Ob Dectin-2 jedoch an der angeborenen Immunabwehr der untersuchten superfiziellen Mykosen beteiligt ist, bleibt unsicher.

4.1.5 HBD-2

Gambichler et al. untersuchten 2008 normale Haut und verglichen diese mit Haut bei atopischer Dermatitis und mit Psoriasis-Haut. Sie fanden heraus, dass in gesunder Haut hBD-2 durchaus nachgewiesen werden kann (Lang 2007), jedoch nur in sehr

geringer Konzentration. In diesen Hautproben wies nur die oberste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum (Harder und Schröder 2005) eine Immunfärbung auf. Atopische Dermatitis zeigte eine geringfügig höhere hBD-2-Konzentration. Die höchste Konzentration konnte in Psoriasis-Haut gemessen werden. Zu gleichartigen Ergebnissen kamen de Jongh et al. (2005), Sven Scharf (2011) und Beisswenger und Bals (2005). Hörting (2007) verglich gesundes Gewebe mit präkanzerösen Läsionen und Plattenepithelkarzinomen. Laut seiner Studie weist normale Haut nur zu 37 % eine schwache hBD-2-Produktion auf und in 29,6 % der Fälle gar keine. Zu 72,2 % war normales Tonsillengewebe immunhistochemisch sogar negativ auf hBD-2. Allerdings konnte an durch chronischen Einfluss von Noxen wie Nikotin und Alkohol entzündetem Tonsillengewebe in 48,0 % der Fälle eine starke Produktion von hBD-2 im Epithel gezeigt werden. Garcia-Madrid et al. (2011) kamen zu dem Ergebnis, dass hBD-2 nicht in unstimulierten, also gesunden, Keratinozyten produziert wird. Gemäß ihrer Ergebnisse wird die Produktion von hBD-2 am meisten durch LPS stimuliert.

In unserer Studie konnte in den einzelnen Hautschichten gesunder Haut keine Immunreaktion von hBD-2 nachgewiesen werden, was die Studie von Garcia-Madrid et al. (2011) bestätigt und die anderen erwähnten Studien nicht widerlegt, da bei diesen nur geringe hBD-2 Konzentrationen in gesunder Haut nachgewiesen wurden. Diese geringe Abweichung in unseren Ergebnissen kann Messungenauigkeiten zugeschrieben werden.

Außerdem unterstützt es die Aussage, dass bei beiden oberflächlichen Mykosen die angeborene Immunabwehr aktiviert wird. Die Begründung dafür ist, dass hBD-2 erst wenn entzündliche Mediatoren, wie LPS und proinflammatorische Cytokine wie TNF- α und IL- β ausgeschüttet werden, vermehrt exprimiert wird. Diese Mediatoren aktivieren auch die Monozyten des angeborenen Immunsystems. hBD-2 befand sich am häufigsten im Stratum corneum sowohl bei Tinea als auch bei PV. Bei beiden superfiziellen Mykosen war die Anfärbbarkeit signifikant häufiger als bei gesunder Haut. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass bei den untersuchten Krankheiten schon im Stratum corneum das angeborene Immunsystem aktiviert wird. hBD-2 induziert die Migration von dendritischen Zellen und Gedächtniszellen. Dafür bedient es sich eines funktionellen Chemokinrezeptors, des CCR6. Dieser Rezeptor

wiederum scheint das angeborene Immunsystem mit dem erworbenen zu verbinden (Niyonsaba et al. 2002).

Gemäß unserer Ergebnisse ist hBD-2 an der natürlichen Abwehr beider untersuchten Mykosen in den obersten Hautschichten beteiligt. Möglicherweise können die Mykosen, verhindert durch die aktivierte Abwehr, nur erschwert in tiefere Hautschichten eindringen und bleiben oberflächliche Infektionen.

4.1.6 HBD-3

Untersucht man die hBD-3-Expression bei atopischer Dermatitis und bei Psoriasis, kann man bei beiden Hautkrankheiten erhöhte hBD-3-Konzentrationen nachweisen (Nagaoka et al. 2008). Der Antikörper gegen das Defensin lässt sich immunologisch bei gesunder Haut vor allem im Stratum spinosum erkennen (de Jongh et al. 2005).

Hörtling (2007) fand in seiner bereits oben beschriebenen Studie heraus, dass in normaler Haut zu 29,6 % die Expression von hBD-3 schwach ist. Zum selben Prozentsatz wies normale Haut allerdings auch eine starke hBD-3-Expression auf. Normale Tonsillen wiesen zu 55,6 % eine mäßige Produktion auf. Jedoch zeigten Tonsillen, die unter starken Noxen standen, mit 76 % eine starke Produktion.

Sawamura et al. (2005) verglichen die hBD-3-Expression gesunder Haut mit der in Hautulzerationen und kamen zu dem Ergebnis, dass in Ulzerationen eine 2,5-fach erhöhte Expression zu verzeichnen ist.

Zu ähnlichen Ergebnissen, wie von Sawamura et al. (2005), kommt unsere Studie. Wir konnten in gesunder Haut im Stratum corneum selten hBD-3 nachweisen, jedoch waren Färbungen bei PV und Tinea deutlich häufiger. In dieser Epidermisschicht konnte gezeigt werden, dass bei PV und Tinea statistisch signifikant häufiger hBD-3 vorhanden ist als in gesunder Haut. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussage, dass die hBD-3-Expression durch äußere Reize wie Bakterienkontakt stimulierbar ist. Da hBD-3 auch gegen *Candida albicans* wirkt, könnte eine Analogie zu Sprosspilzen gezogen werden. Somit ist nachvollziehbar, warum bei den oberflächlichen Mykosen

signifikant mehr hBD-3 vertreten ist. Eine Aufgabe von hBD-3 ist die chemotaktische Aktivierung von Monozyten (Pernet 2003), die die angeborene und die erworbene Immunantwort verknüpfen. So würde im Stratum corneum unmittelbar die natürliche Abwehr stimuliert werden und darauf folgend die spezifische.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Defensinexpression ebenfalls durch Dermatophyten und Malassezia-Arten angeregt wird. HBD-3 hat einen antimikrobiellen Effekt, stimuliert die angeborene Immunabwehr und wirkt chemotaktisch auf Immunzellen, besonders periphere Blutmonozyten (Pernet et al. 2003). Zusammenfassend ist hBD-3 bei Tinea und PV immunmodulatorisch wirksam.

Im Hinblick auf die Abwehrmechanismen bei beiden superfiziellen Mykosen lassen die hBD-3-Immunfärbungen keinen grundsätzlichen Abwehrunterschied erkennen. Die Expression spielt sich in den oberen Hautschichten ab, besonders im Stratum corneum. Dies deutet darauf hin, dass wie bei hBD-2 bereits hier eine Abwehrreaktion aktiviert wird. Weder im Stratum basale noch in der Dermis konnte in den angefärbten Hautproben hBD-3 nachgewiesen werden. Ein Eindringen von Dermatophyten oder Malassezia-Arten in diese Hautschichten kommt bei den superfiziellen Infektionen normalerweise nicht vor.

4.1.7 RNase7

RNase7 wird bereits in gesunder Haut konstitutiv produziert und exprimiert (Harder und Schröder 2002). Die Immunhistochemie zeigt, dass dieses antimikrobielle Peptid bei gesunder Haut in allen Hautschichten vorkommt. Besonders ist es in den oberen ausdifferenzierten Hautschichten, vor allem im Stratum corneum, nachweisbar (Zanger et al. 2009; Gläser et al. 2009).

Die Produktion steigt in atopischer Dermatitis und in Psoriasis an. Vergleicht man dabei atopische Dermatitis mit Psoriasis, ist eine höhere RNase7-Konzentration in atopischer Dermatitis zu finden. Beide Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant (Gambichler et al. 2008).

Unsere Werte bestätigen die Aussage, dass RNase7 in gesunder Haut vor allem in der oberen Hautschicht, dem Stratum corneum, zu finden ist. Jedoch konnten wir keine RNase7 in den Hautschichten unterhalb des Stratum granulosums nachweisen. Bei Tinea und PV ist RNase7 ebenfalls in den beiden oberen Hautschichten, dem Stratum corneum und dem Stratum granulosum nachzuweisen. Dass sich RNase7 auch bei den superfiziellen Mykosen vor allem in diesen Hautschichten anfärben lässt, kann dadurch begründet werden, dass es bei der angeborenen Abwehr der Haut eine entscheidende Rolle spielt und Keratinozyten der größte RNase7-Lieferant sind. Diese beiden Schichten sind die ersten, die mit den Erregern in Kontakt kommen. So wird die Konzentration von RNase7 durch den Erregerkontakt erhöht und ein Wachstum der Pilze verhindert.

Im Stratum granulosum ist die Anfärbbarkeit der Tineapräparate im Vergleich zu den Präparaten der gesunden Haut statistisch signifikant öfter positiv. Das lässt vermuten, dass RNase7 für Tinea ein Signalpeptid der angeborenen Immunabwehr ist. So wird bei der Tinea im Stratum granulosum eine starke Abwehrreaktion initiiert. Dies verhindert ein weiteres Vordringen der Dermatophyten in tiefere Hautschichten. Weiterhin ist anzunehmen, dass die Expression von RNase7 mitunter durch den Kontakt mit den Erregern von superfiziellen Mykosen erhöht wird.

Es muss weiter erforscht werden, welchen Platz die RNase7 in der antimikrobiellen Abwehr einnimmt. Dies wird zurzeit von Hader et al. der Universität Kiel erforscht.

4.1.8 Psoriasin

In gesunder Haut ist Psoriasin nur in sehr geringen Mengen vorhanden (Zheng et al. 2008) und wird vor allem im Stratum corneum produziert (Michalek et al. 2009). Es wird konstitutiv exprimiert, aber auch durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β oder TNF- α reguliert.

Wie Rnase7 wird auch Psoriasin in der Haut von atopischer Dermatitis oder in Psoriasishaut vermehrt produziert. Immunfärbungen zeigen sogar einen bis zu 1500-fach erhöhten Anstieg von Psoriasin im Vergleich zu gesunder Haut (Gläser et al.

2009). Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression von Psoriasin bei atopischer Dermatitis und Psoriasis (Gambichler et al. 2008).

Auch unsere Arbeit bestätigt, dass Psoriasin in gesunder Haut, abgesehen vom Stratum corneum, nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Bei unseren Proben gesunder Haut zeigte es sich sogar nur im Stratum corneum und vereinzelt in der Dermis, was die Aussage von Zheng et al. (2008) bestätigt. Weitaus mehr Psoriasin war in Biopsien der Tinea und PV bis zum Stratum spinosum zu finden. Hierbei konnten im Stratum corneum, Stratum granulosum und im Stratum spinosum im Vergleich zu gesunder Haut sogar statistisch signifikant häufiger positive Färbung nachgewiesen werden. Dass die Expression von Psoriasin in diesen Hautschichten derart erhöht ist, führt zu der Annahme, dass es in der Abwehr von Tinea und PV eine entscheidende Rolle spielt. Für *Escherichia coli* wurde beschrieben, dass Psoriasin antibakteriell wirkt, indem es diesen Erregern das für sie lebenswichtige Zink entzieht. In höheren Konzentrationen soll es auch gegen *Pseudomonas aeruginosa* wirken (Gläser et al. 2009). Dadurch dass Psoriasin die neutrophilen Granulozyten und die CD4+Lymphozyten stimuliert, beeinflusst es die angeborene Immunabwehr genauso wie die spezifische Abwehr. Somit kann geschlossen werden, dass Psoriasin ein konstitutives Peptid ist, das durch Erregerkontakt hochreguliert werden kann (Fritz et al. 2012).

4.2 Schlussfolgerungen und Thesen

In Anbetracht der Tatsache, dass die Erreger der beiden untersuchten superfiziellen Mykosen in den oberen Epidermisschichten lokalisiert sind, ist es nicht verwunderlich, dass die Expressionen der untersuchten Faktoren in diesen Schichten zu finden sind. Die Häufung der beschriebenen AMPs und Signalmoleküle in der oberen Epidermis lässt vermuten, dass sie an der Abwehr gegen Pathogene, die die Haut von außen angreifen, beteiligt sind.

Interessanterweise war eine gelegentliche Expression von hBD-3 und Psoriasin nur in normaler Haut auf das Stratum corneum begrenzt, wohingegen sich in infizierte Haut die Anfärbung auf das Stratum granulosum und das Stratum spinosum

ausbreitete. Ebenfalls wurde RNase7 vermehrt im Stratum granulosum der Tinea gesehen als in gesunder Haut. Auch TLR2 und TLR4 konnten vermehrt in infizierter Haut sichtbar gemacht werden, wobei hier ein Expressionswechsel von den oberflächlichen Hautschichten gesunder Haut zu den tieferen Schichten der Pilzinfektionen nachvollziehbar wird. Der Wechsel der Expression der AMPs in tiefere Hautschichten konnte offensichtlicher in Tinea als in PV festgestellt werden. Dieses Ergebnis kann der wahrscheinlich höheren Invasivität der Tinea zugeschrieben werden. Dies führt zu der Annahme, dass in schwereren Hautinfektionen die angeborene Immunantwort bereits in den tieferen Hautschichten beginnt. So wurden hBD-2, hBD-3 und Psoriasin zwar in gesunder Haut entdeckt, aber unseren Ergebnissen zufolge in den superfiziellen Mykosen stark heraufreguliert. Gleiches konnte für RNase7 festgestellt werden. Auch die Expression von TLR2 und TLR4 wurde in mykotischen Präparaten häufiger festgestellt als in normaler Haut. Lediglich bei TLR9 und Dectin-2 konnte kein signifikanter Unterschied der Expression von normaler Haut und mykotischer Haut festgestellt werden. Somit schließen wir, dass eine Beteiligung von Dectin-2 und TLR9 an der Abwehr fraglich ist.

Durch die oben angeführten Ergebnisse wird die Hypothese gestützt, dass die untersuchten AMPs und Signalmoleküle an einer Abwehrreaktion der Epidermis, die durch Tinea und Pityriasis versicolor induziert wurde, beteiligt sind und das angeborene Immunsystem mit aktivieren. Somit kann folgendes Fazit gezogen werden: Sowohl bei der Pityriasis versicolor als auch bei der Tinea wird die erworbene Immunabwehr aktiviert. Durch welchen Weg sie genau aktiviert wird und warum die Erreger in der Epidermis gehalten werden können, konnte auch durch diese Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

4.3 Kritik der Methodik

Zu Beginn der Arbeit musste eine reproduzierbare immunhistochemische Färbemethodik erarbeitet werden. Dazu wurden mehrere Testfärbungen mit den verwendeten Antikörpern durchgeführt, bei denen die Inkubationszeit und die Verdünnungsstufen variiert wurden. Dadurch konnte die bestmögliche

immunohistochemische Färbung mit unseren Antikörpern ermittelt werden, mit der dann alle Färbungen eines Antikörpers durchgeführt wurden.

Besonders bei den Färbungen der Toll-like-Rezeptoren war die unspezifische Hintergrundfärbung und somit die Färbung des Stratum corneums sehr ausgeprägt. Dadurch konnte hier nicht immer eindeutig zwischen spezifischer Färbung für den jeweiligen Antikörper und unspezifischer Hintergrundfärbung unterschieden werden. Dadurch können sich positive Werte im Stratum corneum ergeben haben, die eigentlich der Hintergrundfärbung zuzuschreiben sind. Hier müsste eine eindeutigere Färbemethode entwickelt werden. In unserer Arbeit wurde in Zweifelsfällen das Stratum corneum teilweise aus der Auswertung ausgeschlossen. Dies relativiert die statistische Aussagefähigkeit, da sich oft gerade im Stratum corneum Abwehrreaktionen ereignen.

Zur Färbung der Präparate wurden außer für Psoriasin nur polyklonale Antikörper verwendet. Besonders für die Antikörper hBD-2 und hBD-3 wurden Homologien beschrieben, genauso wie für die Antikörper TLR2, TLR4 und TLR9. Dadurch kann sich hier eine weitere Fehlerquelle ergeben. Jedoch sind bis heute keine Studien mit monoklonalen Antikörpern bekannt und es stehen keine monoklonalen Antikörper zur Routinediagnostik zur Verfügung. Daher bleibt abzuwarten, ob Studien mit monoklonalen Antikörpern zu anderen Ergebnissen führen.

Um die jeweiligen Hautkrankheiten mit gesundem Gewebe zu vergleichen, wurden unter anderem Randschnitte von bereits untersuchten histologischen Routinepräparaten verwendet. Bei diesen Präparaten gestaltete es sich recht schwierig, die genaue Abgrenzung zum gesunden Gewebe zu ziehen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in der Auswertung des gesunden Gewebes in Randbereichen etwas nicht vollständig normale Haut befand und so die Auswertung beeinträchtigt hat. Allerdings wurde für die Kontrollen nur Haut aus dem Randbereich von melanozytären Nävi verwendet, die nicht entzündlich verändert war, so dass diese potentielle Fehlerquelle nicht relevant erscheint.

Auch Präparate der superfiziellen Mykosen wurden von bereits in der Routinediagnostik verwendeten Paraffinblöcken geschnitten. Dadurch konnte nicht garantiert werden, dass bei den diversen immunhistochemischen Färbungen für diese Arbeit von jedem einzelnen Block immer für alle separaten Färbungen genügend Material zur Verfügung stand. Um diese Fehlerquelle schon im Vorhinein zu minimieren, wurden die Blöcke zu Beginn der Arbeit sorgfältig untersucht und bewertet, ob für die diversen Färbedurchgänge genügend Material zur Verfügung stand.

Die verwendeten Biopsate wiesen unterschiedliche Schweregrade und Entwicklungsstadien der jeweiligen Hautmykosen auf, unter denen nicht unterschieden wurde. Ebenfalls wurde bei den Biopsien kein Unterschied zwischen einem frühen oder akutem Stadium und einer chronischen oder aggressiven Verlaufsform gemacht. Dies war aufgrund der begrenzten Auswahl an Gewebelöcken nicht möglich und führt somit zu einer von uns erwarteten Heterogenität der Ergebnisse. Doch wurde diese Unsicherheit in Kauf genommen, da für eine Studie wie diese eine eigene Entnahme gesunder Haut von Probanden nicht zu rechtfertigen war.

Die Auswertung der histologischen Präparate wurde durch eine reine Ja-/ Nein-Entscheidung vorgenommen, da bisher keine andere anerkannte und gesicherte Einteilung zu dieser Auswertung existiert. Diese Entscheidung wurde nach einer kritischen Beurteilung der Färbungen getroffen, die erbracht hat, dass eine differenzierte Abstufung nicht zuverlässig möglich war. Daher war diese Einteilung adäquat für unsere Studie. Wünschenswert wäre natürlich eine sensitivere Methode, um Fehlern, die durch unspezifische Färbung entstehen können, zu vermeiden. Es sollte angestrebt werden, eine Abstufung in der Anfärbbarkeit der Präparate vorzunehmen und die Anfärbbarkeit so in der Intensität und bestimmten Zellpopulationen zugeordnet differenziert zu beurteilen. Jedoch wurden unsere Ergebnisse von zwei weiteren unabhängigen Untersuchern (Prof. Proksch und Claudia Neumann) ausgewertet. So konnten einzelne Beurteilungen korrigiert werden und falschen Aussagen konnte vorgebeugt werden.

Mit jeweils circa 10 Präparaten pro auszuwertender Gruppe sind die Fallzahlen dieser Studie gering, vor allem da den geringen Fallzahlen eine große Antikörperauswahl gegenüber gestellt wurde. Somit ergaben sich in der statistischen Auswertung nicht immer signifikante Aussagen. Diese Studie sollte daher als Pilotstudie angesehen werden und wichtige Befunde sollten anhand größerer Fallzahlen validiert werden.

Zusätzlich ist anzumerken, dass bisher keine klinischen Studien zu unserem Studiendesign vorhanden sind und die Ergebnisse daher nur mit ähnlichen Studien verglichen werden konnten.

5 Zusammenfassung

Infektionen der Haut durch Dermatophyten (Tinea) und Malassezia-Arten (Pityriasis versicolor) sind sehr häufig und werden oft chronisch. Die verursachenden Pilze verbleiben dabei meist im Stratum corneum. Welche wirtsseitigen Abwehrmechanismen für diese Eingrenzung eine Rolle spielen, ist noch nicht endgültig geklärt. Da Leukozyten nur spärlich in die Hornschicht gelangen, liegt die Vermutung nahe, dass nicht-zelluläre Komponenten zur epidermalen Abwehr dieser superfiziellen chronischen Mykosen beitragen. In dieser Arbeit wurde daher die Expression von TLR2, TLR4, TLR9, Dectin-2, hBD-2, hBD-3, RNase7 und Psoriasin in läsionaler Epidermis bei superfizieller Tinea und Pityriasis versicolor untersucht. Dafür wurden Hautbiopsien von gesunder Haut, Tinea und Pityriasis versicolor mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen auf die Expression der genannten Faktoren analysiert. Es handelte sich um früher zur Diagnostik gewonnene formalinfixierte Biopsate, die in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, archiviert waren. Die Immunfärbungen wurden für die verschiedenen Schichten der Epidermis separat mikroskopisch beurteilt und statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass sowohl bei der superfiziellen Tinea als auch bei der Pityriasis versicolor die Expression vieler abwehrrelevanter, antimikrobieller Peptide und Signalmoleküle verstärkt wird. Die Färbungen für TLR2, TLR4, hBD-2, hBD-3, RNase7 und Psoriasin waren in den Präparaten beider Pilzinfektionen in den oberen Epidermislagen signifikant häufiger positiv als bei den Kontrollen. Für TLR9 und Dectin-2 zeigten sich solche Unterschiede nicht. Die Dermis zeigte für keinen der untersuchten Faktoren eine positive Immunfärbung. Diese Ergebnisse lassen mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten, dass die Expression der untersuchten Abwehrfaktoren, außer von TLR9 und Dectin-2, durch die Mykosen stimuliert wird. Die nachgewiesenen Faktoren können nicht von Korneozyten, aber von den Keratinozyten des Stratum spinosum gebildet werden. Obwohl bei beiden Mykosen die Erreger fast ausschließlich im nicht vitalen Stratum corneum lokalisiert bleiben, aktivieren sie also offenbar das tieferliegende Stratum spinosum zu einer antimikrobiellen Abwehr. Welche spezifischen Funktionen die

5 Zusammenfassung

untersuchten Rezeptoren und Faktoren bei der Pilzabwehr einnehmen, muss noch untersucht werden.

6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

Aberg, K. M., Man, M. Q., Gallo, R. L., Ganz, T., Crumrine, D., Brown, B. E., Choi, E. H., Kim, D. K., Schröder, J. M., Feing, K., Elias, P. M. (2008): Co-regulation and interdependence of the mammalian epidermal permeability and antimicrobial barriers. *J. Invest. Dermatol.* 128(4):917–925

Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Gruber, F., Schröder, J. M., Tschachler, E. (2008): Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli*. *The FASEB Journal* 22(7):2168–2176

Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas R. M., Wagner, H. (2002): Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32(7):1958–1968

Andrews, M., Burns, M. (2008): Common tinea infections in children. *Am. Fam. Physician.* 77(10):1415–1420

Aragane, Y., Maeda, A., Schwarz, A., Tezuka, T., Ariizumi, K., Schwarz, T. (2003): Involvement of dectin-2 in ultraviolet radiation-induced tolerance. *J. Immunol.* 171(7):3801–3807

Ariizumi, K., Shen, G. L., Shikano, S., Ritter 3rd, R., Zukas, P., Edelbaum, D., Morita, A., Takashima, A. (2000): Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 275(16):11957–11963

Baker, B. S., Ovigne, J. M., Powles, A. V., Corcoran, S., Fry, L. (2003): Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 148(4):670–679

Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G. B. (2001): Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(16):9237–9242

Beisswenger, C., Bals, R. (2005): Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem. Immunol. Allergy* 86:55–71

Croston, G. (2012): BioCarta - Charting Pathways of Life. http://www.biocarta.com/pathfiles/h_tollPathway.asp. Zugegriffen am 23.09.2012

Blanco, J. L., und Garcia, M. E. (2008): Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125(1-2):47–70

Blobel, C. (2011): Expressionen von Toll-like-Rezeptoren bei entzündlichen Dermatosen. *Med. Diss., Kiel*

Boardman, C. R., Malkinson, F. D. (1962): Tinea versicolor in steroid-treated patients. Incidence in patients with chronic ulcerative colitis and regional enteritis treated with corticotropin and corticosteroids. *Arch. Dermatol.* 85:44–52

Braun-Falco, O., Wolff, H. H., Plewig, G., Landthaler, M. (2005):. *Dermatologie und Venerologie*. Springer-Medizin-Verlag. Heidelberg

Burke, R. C. (1962): Investigations in tinea versicolor: lipid and amino acid studies. *Yale. J. Biol. Med.* 35:206–221

Cabañes, F. J., Hernández, J. J., Castellá, G. (2005): Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 43(1):277–283

Campos, M. R. M., Russo, M., Gomes, E., Almeida, S. R. (2006): Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes and Infection* 8(2):372–379

Cove, J. und Eady, E. A. (1998): Cutaneous antimicrobial defense. *Clinics in Dermatology* 16:141–147

Crespo-Erchiga, V, Gómez-Moyano, E., Crespo, M. (2008): Pityriasis versicolor and the yeasts of genus *Malassezia*. *Actas. Dermosifiliogr.* 99(10):764–771

Criado, P. R., de Oliveira, C. B., Dantas, K. C., Takiguti, F. A., Benini, L. V., Vasconcellos, C. (2011): Superficial mycosis and the immune response elements. *An. Bras. Dermatol.* 86(4):726–731

Curry, J. L., Qin, J.-Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J., Nickoloff, B. J. (2003): Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127(2):178–186

Dahl, M. V., Grando, S. A. (1994): Chronic dermatophytosis: what is special about *Trichophyton rubrum*? *Adv. Dermatol.* 9:97–109; discussion 110–111

De Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L. J. M., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P. G., Blokx, W., Dogan, A., Hiemstra, P. S., van de Kerkhof, P. C., Schalkwijk, J. (2005): High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* 125(6):1163–1173

De Koning, H. D, Rodijk-Olthuis, D., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., Schalkwijk, J., Zeeuwen P. L. J. M. (2010): A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 130(11):2611–2620

Diamond, G., Bevins, C. L. (1998): Beta-defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clinical Immunology and Immunopathology* 88(3):221–225

Eaton-Bassiri, A., Dillon, S. B., Cunningham, M., Ryczyn, M. A., Mills, J., Sarisky, R. T, Mbow, M. L. (2004): Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity* 72(12):7202–7211

Flores, J., Castillo, V., Franco, F., Huata, A. (2009): Superficial fungal infections: clinical and epidemiological study in adolescents from marginal districts of Lima and Callao, Peru. *J. Infect. Dev. Ctries.* 3(4):313–317

Fritz, P., Beck-Jendroschek, V., Brasch, J. (2012): Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human beta-defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin. *Med. Mycol.* 50(6):579–584

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

Ganz, T. (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3(9):710–720

García-Madrid, L. A., Huizar-López, M., Flores-Romo, L., Islas-Rodríguez, A. E. (2011): *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. *Central European Journal of Biology* 6(6):902–910

Ghosh, S., Dey, S. K., Saha, I., Barbhuiya, J., Ghosh, A., Roy, A. K. (2008): Pityriasis versicolor: a clinicomycological and epidemiological study from a tertiary care hospital. *Indian J. Dermatol.* 53(4):182–185

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., Köten, B., Wittersheim, M., Harder, J. (2011): Psoriasin: key molecule of the cutaneous barrier? *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 9(11):897-902

Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J. M., Schwarz, T. (2009): 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): UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(5):1117–1123

Graham, L. M., Brown, G. D. (2009): The dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine* 48(1-2):148–155

Guého, E., Midgley, G., Guillot, J. (1996): The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69(4):337–355

Guillot, J., Guého, E. (1995): The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67(3):297–314

Gupta, A. K., Batra, R., Bluhm, R., Faergemann, J. (2003): Pityriasis versicolor. *Dermatol. Clin.* 21(3):413–429

Hainer, B. L. (2003): Dermatophyte infections. *Am. Fam. Physician* 67:101–108

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M. (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387(6636):861

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J. M. (2004): Differential gene induction of human [beta]-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J. Investig. Dermatol.* 123(3):522–529

Harder, J., Schröder, J. M. (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *Journal of Biological Chemistry* 277(48):46779–46784

Harder, J., Schröder, J. M. (2005): Antimicrobial peptides in human skin. *Chem. Immunol. Allergy* 86:22–41

Hay, R. J. (1996): Yeast infections. *Dermatol. Clin.* 14:113–124

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813):740–745

Hof, H. 2003. *Mykologie für Mediziner*. 1. Aufl. Thieme. Stuttgart

Hörtling, P. A. (2007): Vergleichende immunhistochemische Charakterisierung der humanen Beta-Defensin 1-3 Produktion in gesundem Gewebe, präkanzerösen Läsionen und Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx. *Med.Diss.* Lübeck

Holm, S. (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6(2):65-70

Huh, W. K., Oono, T., Shirafuji, Y., Akiyama, H., Arata, J., Sakaguchi, M., Huh, N., Iwatsuki, K. (2002): Dynamic alteration of human β -defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. *Journal of Molecular Medicine* 80(10):678–684

Janaki, C., Sentamilselvi, G., Janaki, V. R., Boopalraj, J. M. (1997): Unusual observations in the histology of Pityriasis versicolor. *Mycopathologia* 139(2):71–74

Jarrousse, V., Quereux, G., Marques-Briand, S., Knol, A. C., Khammari, A., Dreno, B. (2006): Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Eur. J. Dermatol.* 16(6):636-641

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(7):1720–1727

Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P. A., Chamailard, M., Trottein, F., Poulain, D. (2006): Specific recognition of candida albicans by macrophages requires galectin-3 to discriminate saccharomyces cerevisiae and needs association with TLR2 for signaling. *Journal of Immunology* 177(7):4679–4687

Kamalam, A., Thambiah, A. (1979): Tinea capitis in South Indian families. *Mykosen* 22(7):251–254

Kanazawa (a), N., Tashiro, K., Inaba, K., Lutz, M. B., Miyachi, Y. (2004): Molecular cloning of human dectin-2. *J. Invest. Dermatol.* 122(6):1522–1524

Kanazawa (b), N., Tashiro, K., Miyachi, Y. (2004): Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology* 209(1-2):179–190

Kawai, K., Shimura, H., Minagawa, M., Ito, A., Tomiyama, K., Ito, M. (2002): Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* 30(3):185–194

Kiemer, A. K. (2008): Angeborenes Immunsystem: TLR eröffnen neue Möglichkeiten. *Pharmazeutische Zeitung online* 04/2008

Kim, S. K., Park, S., Lee, E. S. (2010): Toll-like receptors and antimicrobial peptides expressions of psoriasis: correlation with serum vitamin D level. *Histopathology* 25(10):1506–1512

Kim, Y. M., Romero, R., Chaiworapongsa, T., Espinoza, J., Mor, G., Kim, C.J. (2006): Dermatitis as a component of the fetal inflammatory response syndrome is associated with activation of Toll-like receptors in epidermal keratinocytes. *Histopathology* 49(5):506–514

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

Ku, J. K., Kwon, H. J., Kim, M. Y., Kang, H., Song, P. I., Armstrong, C. A., Ansel, J. C Kim, H. O., Park, Y. M. (2008): Expression of Toll-like receptors in verruca and molluscum contagiosum. *J. Korean Med. Sci.* 23(2):307–314

Lang, C. (2007): Nachweis von antimikrobiellen Peptiden in den Epithelien von Atemwegen, Gastrointestinaltrakt, Urogenitalorganen, Reproduktionsorganen und Haut bei Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) und Mensch. *Med. Diss. München*

Lee, K. C., Eckert, R. L. (2006): S100A7 (Psoriasin) - mechanism of antibacterial action in wounds. *J. Invest. Dermatol.* 127(4):945–957

Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L., Ganz, T. (2002): Human [beta]-Defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *Nature* 118(2):275–281

Lott, T. J., Magee, P. T., Barton, R., Chu, W., Kwon-Chung, K. J., Grindle, S., Homma, M., Iwaguchi, S., Kelly, R., Lasker, B. A. (1992): The molecular genetics of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:77–85

Lu, Q., Jayatilake, J. A. M. S., Samaranayake, L. P., Jin, L. (2006): Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of human [beta]-defensins in experimental oral candidiasis. *J. Invest. Dermatol.* 126(9):2049–2056

Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honoré, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A. H., Basse, B. (1991): Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* 97(4):701-712

Michalek, M., Gelhaus, C., Hecht, O., Podschun, R., Schröder, J. M., Leippe, M., Grötzinger, J. (2009): The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes. *Developmental & Comparative Immunology* 3(6):740–746

Mittag, H. (1994): Fine structural investigation of *Malassezia furfur*: Size and shape of the yeast cells and a consideration of their ploidy. *Mycoses* 37(11-12):393–399

Morishita, N., Sei, Y., Takiuchi, I., Sugita, T. (2005): Examination of the causative agent of Pityriasis versicolor. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi Mycology* 46(3):169–170

Nagaoka, I., Niyonsaba, F., Tsutsumi-Ishii, Y., Tamura, H., Hirata, M. (2008): Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. *Int. Immunol.* 20(4):543–553

Narbonne-Reveau, K., Charroux, B., Royet, J. (2011): Lack of an antibacterial response defect in drosophila Toll-9 mutant. *PLoS ONE* 6(2): e17470

Netea, M. G., van der Graaf, C. A. A., Vonk, A. G., Verschueren, I., van der Meer, J. W. M., Kullberg, B. J. (2002): The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases* 185(10):1483–1489

Nishimura, K., Asada, Y., Tanaka, S., Watanabe, S. (1991): Ultrastructure of budding process of *Malassezia pachydermatis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 29(6):387–393

Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Matsuda, H., Ogawa, H., Nagaoka, I. (2002): Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int. Immunol.* 14(4):421–426

Noll, S., Schaub-Kuhnen, S. (2000): *Praxis der Immunhistochemie*. Hrgs. Höfler, H. und Müller, K. M.. Urban & Fischer Verlag. München

Pernet, I., Reymermier, C., Guezennec, A., Branka, J. E., Guesnet, J., Perrier, E., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Viac, J. (2003): Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes. *Experimental Dermatology* 12(6):755–760

Pivarcsi, A., Bodai, L., Réthi, B., Kenderessy-Szabó, A., Koreck, A., Széll, M., Beer, Z., Bata-Csörgö, Magócsi, M., Rajnavölgyi, E., Dobozy, A., Kemény, L. (2003): Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.* 15(6):721–730

Poindexter, B. J. (2005): Immunofluorescence deconvolution microscopy and image reconstruction of human defensins in normal and burned skin. *J. Burns Wounds* 4:e7

Roth, R. R. und James, W. D. (1988): Microbial Ecology of the Skin. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:441–464

Roujeau, J. C., Sigurgeirsson, B., Korting, H. C., Kerl, H., Paul, C. (2004): Chronic dermatomycoses of the foot as risk factors for acute bacterial cellulitis of the leg: a case-control study. *Dermatology* 209(4):301–307

Sato, K., Yang, X. L., Yudate, T., Chung, J., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R. P., Underhill, D., Cruz Jr, P. D., Ariizumi, K. (2006): Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J. Biol. Chem.* 281(50):38854–38866

Sawamura, D., Goto, M., Shibaki, A., Akiyama, A., McMillan, J. R., Abiko, Y., Shimizu, H. (2005): Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. *Gene Ther.* 12(10):857-861

Scharf, S. (2011): Expressionsanalysen von beta-Defensinen und Interleukin-1 beta in der gesunden und pathologisch veränderten Speicheldrüse. *Med. Diss. Bonn*

Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Tack, B. F., Vogel, H. J. (2002): The solution structures of the human beta -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of hBD-3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 277(10):8279–8289

Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H. C. (2005): Human defensins. *Journal of Molecular Medicine* 83(8):587–595

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

Schröder, J. M., Harder, J. (1999): Human beta-defensin-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31(6):645–651

Shiraki, Y., Ishibashi, Y., Hiruma, M., Nishikawa, A., Ikeda, S. (2006): Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J. Med. Microbiol.* 55(9):1175–1185

Slunt, J. B., Taketomi, E. A., Woodfolk, J. A., Hayden, M. L., Platts-Mills, T. A. (1996): The immune response to *Trichophyton tonsurans*: distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 157(11):5192–5197

Sorensen, O. E., Thapa, D. R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A. A., Ganz, T. (2005): Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J. Immunol.* 174(8):4870–4879

Sumikawa, Y., Asada, H., Hoshino, K., Azukizawa, H., Katayama, I., Akira, S., Itami, S. (2006): Induction of [beta]-defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. *Microbes and Infection* 8(6):1513–1521

Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., Klinman, D. M. (2001): Cutting edge: role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* 167(7):3555 –3558

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11(4):443–451

(o.A.) (o.J): The R Project for Statistical Computing.
<http://www.r-project.org/>. Zugegriffen am 10.03.2012

Thompson, E., Colvin, J. R. (1970): Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani and Chalmers. *Can. J. Microbiol.* 16(4):263–265

Tietz, H. J., Ulbricht, H. (1999): *Humanpathogene Pilze der Haut und Schleimhäute: Entnahme, Anzucht, Differenzierung.* Schlütersche Verlag. Hannover

Turchin, I., Baran, B., Alanen, K., Saxinger, L. (2005): Dermacase. Dermatophyte infection (tinea). *Can. Fam. Physician Médecin* 51:499-501

Van der Graaf, C. A. A., Netea, M. G., Verschueren, I., van der Meer, J. W. M., Kullberg, B. J. (2005): Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect. Immun.* 73(11):7458–7464

Villamón, E., Gozalbo, D., Roig, P., O'Connor, J. E., Fradelizi, D., Gil, M. L. (2004): Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and Infection* 6:1–7

Watanabe, S., Kano, R., Sato, H., Nakamura, Y., Hasegawa, A. (2001): The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J. Investig. Dermatol.* 116(5):769–773

Watson, P. H., Leygue, E. R., Murphy, L. C. (1998): Psoriasin (S100A7). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30(5):567–571

Wilson, E. B. (1927): Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association* 22(158):209–212

Wilson score interval calculator – Wolfram|Alpha (o.J.): <http://www.wolframalpha.com/input/?i=Wilson+score+interval+calculator>. Zugegriffen am: 23.09.2013

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O., Oppe, J. J. (1999): Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286(5439):525–528

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

Zhang, J., Dyer, K. D., Rosenberg, H. F. (2003): Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* 31(2):602–607

Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Nagaoka, I., Okumura, K., Ogawa, H. (2008): Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology* 124(3):357–367

Abbildung 1-18

Eigene Erstellung in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel

Abbildung 19

Shih, M. (2012): BioCarta – Charting Pathways of Life 2012.
http://www.biocarta.com/pathfiles/h_tollPathway.asp. Zugegriffen am 24.09.2013

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jochen Brasch, der mir das Thema vergeben und die Arbeit hervorragend und immer zuverlässig und zeitnah betreut hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des UKSH, Campus Kiel, für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Ein ganz herzlicher Dank gebührt Frau Claudia Neumann für die Geduld und Einarbeitung meiner Person in die molekularbiologischen Methoden und stetige Hilfestellung.

Frau Prof. Dr. med. Regine Gläser danke ich für die Bereitstellung verschiedener histologischer Präparate und eines Antikörpers, sowie Herrn Dr. rer. nat. Lange für die Bereitstellung eines weiteren Antikörpers.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Arne Jochens und Herrn Dr. Tibor Schuster für die Hilfestellung im statistischen Teil der Arbeit bedanken.

Bei Herrn Stefan Feuerstein möchte ich mich für die hervorragende technische und didaktische Hilfestellung bedanken, außerdem für die Geduld mit mir.

Zuletzt danke ich meinem Vater für die stetige Motivation und sein Vertrauen.

8 LebenslaufPersönliche Angaben

Name	Anke Mörig
Geburtsdatum	29.10.1985
Geburtsort	Böblingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Bildungsweg

09/1992-07/1996	Grundschule: Henneberg-Volksschule Bad Kissingen
09/1996-07/2005	Jack-Steinberger-Gymnasium Bad Kissingen
10/2005-04/2008	Vorklinischer Abschnitt des Zahnmedizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2008-12/2010	klinischer Abschnitt des Zahnmedizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Beruflicher Werdegang

07/2011-07/2013	Zweijährige Assistenzzeit in der Gemeinschaftspraxis Dres. Brückmann / Krümpelmann in Landshut
08/2013-heute	Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dr. Belger & Kollegen in Goslar

Dissertation:

2009-12/2013	vorliegende Dissertation
--------------	--------------------------