

Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

Charakterisierung des Interleukin-26 in der Rosazea

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Laura Jasmin Gayk
(2021)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: PD Dr. Stephan Meller

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Martin Wagenmann

„Hab Geduld in allen Dingen,
vor allem aber mit Dir selbst.“

Franz von Sales

Zusammenfassung

Die Rosazea (Synonyme: Rosacea, Acne Rosacea, Kupferrose, Kupferrinne) ist eine häufige chronisch-entzündliche Hauterkrankung. Es entstehen Erytheme, Teleangiektasien, Papeln und Pusteln im zentralen Gesichtsbereich. Histopathologisch finden sich in der Dermis entzündliche Immunzellinfiltrate um dilatierete Blutgefäße und Haarfollikel. Sie setzen sich aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und anderen Immunzellen wie T_H17-Zellen zusammen. Diese wiederum produzieren Interleukine, die Immunzellen und strukturelle Zellen der Haut aktivieren können. Zu den T_H17-assoziierten Proteinen gehört auch das inflammatorisch und antimikrobiell wirkende Interleukin-26 (IL-26) aus der Interleukin-10-Familie. IL-26 kann, analog zum *cathelicidin antimicrobial peptide* (CAMP, alternativ LL-37) an anionische DNA-Moleküle binden und dadurch Immunzellen aktivieren.

Für das antimikrobielle, humane β -Defensin 1 (*human defensin beta 1*, DEFB1) wurde beschrieben, dass es unter reduzierenden Bedingungen eine deutlich erhöhte Aktivität aufweist und Bakterien effizienter abtötet. Dies wird auf die Aufspaltung der Disulfidbrücken und eine damit einhergehende Strukturänderung zurückgeführt. Innerhalb von Entzündungsreaktionen wie in der Rosazea liegen möglicherweise auch hypoxische beziehungsweise reduzierende Bedingungen vor, die sich auf die Struktur, Funktion und Bindungsaktivität des IL-26, das wie das DEFB1 Disulfidbrücken aufweist, auswirken könnten. Auf der Grundlage dieser Annahmen wurde die Hypothese geprüft, dass reduziertes IL-26 unter reduzierenden Bedingungen eine veränderte biologische Aktivität aufweisen könnte und am Beispiel der Rosazea eine mögliche pathologische Relevanz dieses Phänomens dargestellt.

Aus diesem Grund wurden die Effekte von reduzierenden Bedingungen auf die Bindungsaktivität von IL-26 sowie die Synthese von IL-26 und des physiologischen Redoxsystems, bestehend aus Thioredoxin (TXN) und Thioredoxinreduktase (TXNRD), in der Rosazea analysiert.

In dieser Arbeit wurden Biopsien gesunder Haut von 28 ProbandInnen und 28 Hautbiopsien von PatientInnen mit Rosazea in verschiedenen Stadien untersucht. Mittels Genanalysen und ELISA konnte demonstriert werden, dass die Menge von IL-26 in läsionaler Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene signifikant erhöht ist. Zudem ist die Bindungsaktivität von IL-26 an DNA *in vitro* unter reduzierenden Bedingungen verstärkt. Auch die Menge von TXN ist in läsionaler Rosazea signifikant erhöht. Dabei korreliert die TXN-Menge positiv mit der Menge von IL-26.

Zusammengefasst suggerieren diese Ergebnisse nicht nur eine pathogenetische Beteiligung des IL-26 in der Rosazea, sondern auch eine Verstärkung der proinflammatorischen Effekte des IL-26 unter reduzierenden Bedingungen, wie sie wahrscheinlich in der Rosazea vorliegen.

Summary

Rosacea is a common inflammatory skin disorder. Erythema, papules, pustules and teleangiectasia occur in the central area of the face. Histopathological investigations show that inflammatory immune cell infiltrates around enlarged vessels and hair follicles in the dermis. These infiltrates consist of lymphocytes, neutrophils, granulocytes, macrophages and other immune cells such as T_H17 cells. T_H17 cells secrete interleukins, which can activate immune cells and structural cells of the skin. Interleukin-26 (IL-26), analogous to the cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP or LL-37), is able to bind to anionic DNA molecules and thereby activate immune cells.

Another antimicrobial peptide, the human defensin beta 1 (DEFB1) has been shown to have significantly increased activity to kill bacteria more efficiently under reducing conditions. This is attributed to the decomposition of disulfide bridges and accompanying structural changes. Within inflammatory reactions such as in rosacea, there might be reducing conditions that may affect the structure, function and binding activity of IL-26, which has disulfide bridges like DEFB1.

On these grounds, the hypothesis that reduced IL-26 has altered biological activity under reducing conditions should be examined, and a potential pathological relevance of this phenomenon should be presented using the example of rosacea. For this reason, the effects of reducing conditions on the binding activity of IL-26 and the synthesis of IL-26 and the physiological redox system, consisting of thioredoxin (TXN) and thioredoxin reductase (TXNRD1), were examined in rosacea.

This work examines biopsies of healthy skin from 28 subjects and 28 skin biopsies from patients with rosacea in different stages. Genetic analyses and ELISA showed that IL-26 is significantly increased on gene and protein level in samples of lesional rosacea compared to skin of healthy subjects. In addition, under reducing conditions, the binding activity of IL-26 to DNA *in vitro* is amplified. The synthesis of TXN is also significantly increased. These expressions correlate to the expressions of IL-26.

Summary results suggest that a pathogenetic involvement of IL-26 in rosacea, but also that the proinflammatory effects of IL-26 are enhanced under reducing conditions, which are likely to be present in rosacea.

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Albumin aus Rinderserum
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEFB1	<i>human defensin beta 1</i> , humanes β -Defensin-1
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , antikörperbasiertes Nachweisverfahren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10R2	Interleukin-10-Rezeptor 2
IL-20R1	Interleukin-20-Rezeptor 1
LL-37	<i>cathelicidin antimicrobial peptide</i> , <i>CAMP</i> , humanes Cathelicidin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> , spezifischer Transkriptionsfaktor aktivierter B-Lymphozyten
nm	Nanometer
P	<i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
pDCs	<i>plasmacytoid dendritic cells</i> , Plasmazytoide dendritische Zellen
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i> , Mustererkennungsrezeptoren
Rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	<i>relative unit</i> , relative Einheit
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerasekettenreaktion
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
Spearman's Rho (ρ)	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> , Tumornekrosefaktor- α
TXN	Thioredoxin
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1
UVA	Ultraviolette Strahlung im Wellenlängenbereich 320-400 nm
UVB	Ultraviolette Strahlung im Wellenlängenbereich 280-320 nm
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WR	<i>working reagent</i> , Arbeitsreagenz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	1
1.2	Antimikrobielle Peptide	3
1.2.1	Humanes β -Defensin-1	3
1.2.2	Cathelicidin	4
1.3	Interleukin-26	4
1.3.1	Allgemeines	5
1.3.2	Rezeptor des IL-26	6
1.3.3	Wirkung des IL-26	7
1.4	Anatomie der Haut	8
1.5	Entzündung	9
1.6	Thioredoxin und Thioredoxinreduktase	11
1.7	Rosazea	12
1.7.1	Erhöhte Dichte angeborener neuronaler Hautrezeptoren	14
1.7.2	Neurovaskuläre Veränderungen	15
1.7.3	Ungleichgewicht des Immunsystems	15
1.7.4	Entzündungsaktivierung	15
1.7.5	Cathelicidin-induzierte Entzündung	16
1.7.6	Therapie der Rosazea	16
1.8	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	PatientInnen und gesunde ProbandInnen	19
2.2	mRNA-Expressionsanalysen	20
2.2.1	RNA-Isolation	21
2.2.2	cDNA-Synthese mittels reverse Transkriptase PCR	22
2.2.3	qPCR	24
2.3	Verarbeitung von Gewebeproben und Durchführung eines ELISA	25
2.3.1	Homogenisierung von Hautbiopsien	26
2.3.2	Pierce BCA Protein Assay	27
2.3.3	ELISAs zur Detektion von IL-26 und TXN	29
2.4	Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie	32
2.4.1	Gewebeschnitte	32
2.4.2	Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-IL-26 Antikörpern	33
2.4.3	Immunhistochemie mit anti-TXN-Antikörper	34
2.4.4	Mikroskopische Auswertung	35
2.5	Modifizierte DNA-Quantifizierung	36
2.6	Statistik und Auswertungen	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung des IL-26 in der Rosazea	39
3.1.1	Expression von <i>IL26</i> mRNA in der Rosazea	39
3.1.2	Proteinbiosynthese von IL-26 in der Rosazea	40

3.1.3	Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung	43
3.2	Bindung von IL-26 an DNA unter reduzierenden Bedingungen	44
3.3	Untersuchung des Thioredoxinsystems in der Rosazea	45
3.3.1	Expression von Thioredoxin-mRNA in der Rosazea.....	45
3.3.2	Proteinbiosynthese von TXN in der Rosazea	46
3.3.3	Korrelation zwischen der <i>IL26</i> - und der <i>TXN</i> -Genexpression	47
3.3.4	Immunhistochemie mit anti-TXN-Antikörper	48
3.3.5	Expression der <i>TXNRD1</i> in der Rosazea auf Genebene	50
3.3.6	Korrelation zwischen <i>IL26</i> - und <i>TXNRD1</i> -Genexpression	50
4	Diskussion	52
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	64
6	Anhang	70
6.1	DNA mit DTT	70
6.2	Färbungsfotos der Analyse aus Abb. 10	70

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Viren, Bakterien und andere pathogene Mikroorganismen versuchen permanent, die äußeren Schutzbarrieren des menschlichen Körpers zu überwinden [1]. Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen durch diese Pathogene sowie vor Fehlentwicklungen der körpereigenen Zellen, indem es sie detektiert und eliminiert [1].

Das menschliche Immunsystem wird in ein unspezifisches, angeborenes und ein spezifisches, erworbenes System unterteilt [2]. Das unspezifische System ist ohne vorherige Antigenkontakte vorhanden und ermöglicht eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Molekülen. Zu diesem System gehören die Granulozyten, die Monozyten und die natürlichen Killerzellen [2]. Diese Zellen werden im Knochenmark gebildet, zirkulieren im Blut und immigrieren in das Gewebe [2]. Die größte Gruppe der Granulozyten sind die neutrophilen Granulozyten mit einem Anteil von 50-70 % [3]. Sie können Mikroorganismen phagozytieren und in Vesikeln gespeicherte, bakterizide Moleküle synthetisieren. Auch die Monozyten können Erreger abwehren, indem sie Pathogene mithilfe ihrer dendritischen Fortsätze binden, mittels Endozytose aufnehmen und in Lysosomen unschädlich machen. Nach Übertritt der Monozyten in das Gewebe werden sie als Makrophagen beziehungsweise im Bereich der Haut als Histiozyten bezeichnet [2]. Die natürlichen Killerzellen haben eine zytotoxische Aktivität und richten sich hauptsächlich gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen [2].

Alle Zellen des unspezifischen Immunsystems können außerdem durch *Pattern recognition receptors* (PRRs, Mustererkennungsrezeptoren) auch veränderte Umwelteinflüsse, beispielsweise chemische und physikalische Reize, erkennen [4]. Zu diesen PRRs gehören extrazelluläre PRRs und intrazelluläre *NOD-like receptors* (*NOD: nucleotide-binding oligomerization domain*, nukleotidbindende oligomerisierende Domäne) [5, 6]. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einem Anstieg der Zytokine und der antimikrobiellen Proteine (s. Kapitel 1.2) in der Haut [5, 6].

Im Gegensatz zu dem unspezifischen Immunsystem muss das spezifische System erst durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden. Die spezifisch auf das Antigen abgestimmte Immunantwort dauert länger als die des angeborenen Immunsystems. Die wichtigsten Zellpopulationen stellen hier die B- und die T-Lymphozyten dar. Diese Zellen lassen sich voneinander durch ihre Oberflächenmerkmale unterscheiden. Die B-Lymphozyten tragen unter anderem das *Cluster of differentiation* (Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale, CD) 20 und können mithilfe ihrer Rezeptoren Antigene erkennen, endozytieren, prozessieren und die entstehenden Fragmente durch *major histocompatibility complexes* (Haupthistokompatibilitätskomplexe, MHC) II präsentieren. Durch Interaktion mit T-Lymphozyten werden die B-Lymphozyten aktiviert und entwickeln sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen [7].

Die T-Lymphozyten tragen nach ihrer Prägung im Thymus das Oberflächenprotein CD3 und können mithilfe ihrer Rezeptoren körperfremde Moleküle erkennen, welche ihnen auf MHC I und II präsentiert werden [7]. Nach Kontakt mit den präsentierten Molekülen können T-Lymphozyten wiederum die B-Lymphozyten aktivieren. Dadurch werden sie selbst auch aktiviert und differenzieren sich unter Änderung des Antigenrezeptors zu spezialisierten Subpopulationen.

Eine wichtige Population der T-Lymphozyten ist die Gruppe der T-Helferzellen (T_H -Zellen), die den Antigenrezeptor CD4 trägt [2]. Es gibt verschiedene T_H -Zellen mit unterschiedlichen funktionellen Aufgaben. Wie alle aktivierten, blutbildenden Zellen produzieren sie lösliche Mediatoren. Welcher Art eine T_H -Zelle zugeordnet werden kann, entscheidet sich durch ihre Oberflächenrezeptoren und durch die von ihr produzierten Zytokine [8]. So sind T_H1 -Zellen für die zellvermittelte Immunität verantwortlich und produzieren proinflammatorische Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (tumor necrosis factor - α , TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ), um Bakterien und Pilze zu bekämpfen [9, 10]. Aktivierte T_H1 -Zellen fördern durch die synthetisierten Zytokine die Differenzierung und Proliferation weiterer T_H1 -Zellen sowie die Aktivierung von Makrophagen, sodass die entzündlichen Prozesse verstärkt werden. Gleichzeitig

unterdrücken sie die Produktion von T_H2-Zellen. Ist die T_H1-Antwort zu stark ausgeprägt, entsteht durch die Entzündung ein Gewebeschaden [10].

Die Aufgabe der T_H2-Zellen ist in erster Linie, die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen durch die Produktion von Zytokinen zu orchestrieren [9]. Zudem beeinflussen sie einen Wechsel der Antikörperklasse zum Immunglobulin E [9].

Eine weitere Untergruppe sind die T_H17-Zellen. Ihre Aufgabe ist die Abwehr von Bakterien, Pilzen und weiteren Pathogenen [11]. Die T_H17-Zellen lenken entzündliche Reaktionen, indem sie IL (Interleukin)-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-26 produzieren. [12-15]. Eine überschießende T_H17-Zellantwort kann chronische Entzündungen auslösen und die Entwicklung von Autoimmunerkrankheiten beeinflussen [16].

1.2 Antimikrobielle Peptide

Für die Immunantwort der Haut sind die humoralen Komponenten des Immunsystems, die Produkte von Leukozyten und epithelialen Zellen, aber auch sogenannte antimikrobielle Peptide, von großer Bedeutung [2]. Besonders wichtig ist ihre Produktion, wenn die Hautbarriere durch Wunden oder chronisch-entzündliche Hauterkrankungen zerstört ist. Zu den antimikrobiellen Peptiden gehören beispielsweise Defensine, Cathelicidine, RNase 7 und S100-Proteine [17]. Für die Hintergründe dieser Arbeit sind insbesondere die β -Defensine und die Cathelicidine von Bedeutung.

1.2.1 Humanes β -Defensin-1

Defensine sind kleine, kationische Peptide, die Aminosäuren mit Cysteinen besitzen [2]. Sie können sich an die Membranen von Bakterien, Viren und Pilzen binden und diese durch Erhöhung der Membranpermeabilität zerstören [2]. Produziert werden die Defensine von Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten, aber auch durch die Epithelien von Haut und Schleimhaut [2]. Beispiele für Defensine sind das α -Defensin, das von T-Lymphozyten produziert wird und einen hemmenden Einfluss auf das Humane Immundefizienz-Virus (*human immunodeficiency virus*, HIV) hat, und das β -Defensin-2, welches von Schleimhäuten produziert wird und antibiotisch wirkt [2].

Für diese Arbeit ist das humane β -Defensin-1 (*human defensin beta 1*, DEFB1) von Bedeutung [18]. Dieses Defensin besitzt an sechs Aminosäureresten Cysteine, die zu drei intramolekularen Disulfidbrücken oxidiert werden können [18]. DEFB1 wirkt, im Vergleich zu anderen humanen antimikrobiellen Peptiden, unter den üblichen *in vitro* Konditionen kaum antimikrobiell, weist jedoch unter reduzierenden Bedingungen eine deutlich verstärkte Aktivität auf [19]. Dies wird auf die Aufspaltung der Disulfidbrücken durch Oxidation und eine damit einhergehende Strukturänderung zurückgeführt [19].

1.2.2 Cathelicidin

Das einzige bekannte humane Cathelicidin ist das *cathelicidin antimicrobial peptide* (CAMP, alternativ LL-37). Es wird unter anderem von neutrophilen Granulozyten und Keratinozyten produziert und konnte in erhöhten Mengen in Plattenepithelien der Haut und der Schleimhäute sowie im Darm nachgewiesen werden [20-22]. LL-37 fördert die Chemotaxis der Leukozyten [23], die Angiogenese [24], beeinflusst die extrazelluläre Matrix und triggert die Freisetzung von IL-8 aus Keratinozyten [25, 26]. Es kann außerdem mit viraler sowie freier humaner DNA Komplexe bilden und dadurch phagozytierte Bakterien eliminieren, aber auch Autoimmunität fördern [27, 28].

1.3 Interleukin-26

Die Zytokine, die von Lymphozyten synthetisiert werden, heißen Lymphokine oder auch Interleukine. Sie dienen der Kommunikation der Lymphozyten untereinander, der Interaktion mit Makrophagen und anderen Immunzellen sowie strukturellen Zellen der einzelnen Organe [29]. Auch auf die im Gewebeverband lebenden Keratinozyten haben die Interleukine eine Wirkung [29]. Unterschiedliche Interleukine können sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort beeinflussen [9]. Sie sind für die Regulation der Immunität wichtig, da sie Wachstum, Differenzierung und Funktion der Immunzellen kontrollieren. Die meisten Interleukine haben mehr als eine biologische Funktion. Welche Funktion die wichtigste ist, hängt mutmaßlich von dem Milieu ab, in dem die Interleukine produziert werden [30]. Jedem Interleukin wurde nach seiner Entdeckung eine Zahl zwischen 1 und 40 zugeordnet.

1.3.1 Allgemeines

IL-26 wurde im Jahr 2000 das erste Mal beschrieben [31, 32]. Es wurde in T-Zellen, die mit dem Herpesvirus Saimiri infiziert waren, in großer Menge nachgewiesen [31, 32]. Da es aus 155 Aminosäuren besteht und von Andrea Kappe entdeckt wurde, wurde es zunächst AK155 genannt [31]. IL-26 ist ein strukturelles Homolog des humanen IL-10 und hat mit diesem 24,7 % identische Aminosäuren. Weitere 47 % der Aminosäuren dieser beiden Interleukine ähneln einander [31]. Eine Ähnlichkeit zu IL-10 weisen auch IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 [33], IL-28A (auch: IFN- λ 2), IL-28B (auch: IFN- λ 3) und IL-29 (auch: IFN- λ 1) auf [34, 35]. Zwischen den genannten Interleukinen besteht 15 bis 39 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen, lediglich IL-28A, IL-28B und IL-29 weichen mit einer geringeren Übereinstimmung von unter 10 % davon ab. Die zur IL-10-Familie gehörenden Interleukine sind sich strukturell sehr ähnlich, haben jedoch unterschiedliche Funktionen. So hat IL-10 beispielsweise eine immunsuppressive Funktion [36], da es Lymphozyten und blutbildende Zellen reguliert und die Funktionen der Makrophagen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen stark supprimiert [30]. IL-22 hingegen hat proinflammatorische Eigenschaften [37].

Der Locus der chromosomalen Erbinformation des IL-26 liegt auf 12q15, auf dem langen Arm des Chromosom 12 [31]. Die Region für das Interferon- γ befindet sich nur wenige Basenpaare entfernt [31]. Auch die Region für das IL-22 liegt in direkter Nachbarschaft [33]. Bei der Prozessierung der DNA des IL-26 entstehen 5 Exons und 4 Introns [31]. Am N-terminalen Ende befindet sich ein hydrophobes, aus 29 Aminosäuren bestehendes Signalpeptid [33].

Bei Mäusen konnte weder das Protein IL-26 noch ein dafür codierendes Gen gefunden werden [38]. Es wurden nur vereinzelte Exons des Gens detektiert [39]. Nach erfolgter Translation lagern sich vermutlich zwei identische Moleküle IL-26 mit verdrillter, helixartiger Sekundärstruktur zu stabilen Homodimeren zusammen [40]. IL-26 besitzt fünf Cysteine, von denen sich je zwei zu intramolekularen Disulfidbindungen zusammenlagern und eins für die Bindung mit einem Cystein eines anderen IL-26 zur Verfügung steht [41]. Möglicherweise könnte das IL-26 analog zum DEFB1 (s. Kapitel 1.2.1 Humanes β -Defensin-1) aufgrund einer

Reduktion der Disulfidbrücken unter reduzierenden Bedingungen eine veränderte biologische Aktivität aufweisen.

IL-26 hat zahlreiche positiv geladene Aminosäuren, sodass eine kationische Gesamtladung von 18,1 bei neutralem pH-Wert vorliegt (berechnet mittels *Peptide calculator*, Innovagen AB, Schweden). Die Mehrzahl der polaren, kationischen Aminosäuren liegt auf einer Seite des Moleküls, die der hydrophoben Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite [40]. Diese spezielle Verteilung der Aminosäuren wird als amphipatisch bezeichnet. Der isoelektrische Punkt liegt im alkalischen Bereich bei einem pH-Wert von 10,4 [42]. Eine erhöhte Bildung von IL-26 konnte bereits in durch das Herpesvirus Saimiri transformierten T-Zellen detektiert werden [31]. IL-26 wird von T_H1 und T_H17-Zellen sowie von natürlichen Killerzellen produziert [39]. Auch synoviale Fibroblasten können IL-26 herstellen [43]. In den entzündlichen Erkrankungen Psoriasis [13], Rheumatoide Arthritis [43], Multiple Sklerose [44], Colitis Ulcerosa [45] und Morbus Crohn [46] konnte eine erhöhte Menge des Proteins nachgewiesen werden. Allen diesen entzündlichen Erkrankungen werden Fehlregulationen des Immunsystems zugrunde gelegt.

1.3.2 Rezeptor des IL-26

IL-26 bindet an einen heterodimeren Zytokinrezeptor der Zytokinrezeptorklasse II [47]. Dieser befindet sich auf Epithelien der Haut und der Schleimhäute [39, 42, 48]. Er besteht aus dem Interleukin-10-Rezeptor 2 (IL-10R2) und dem Interleukin-20-Rezeptor 1 (IL-20R1) [42]. Beim IL-20R1 handelt es sich um eine die Zellmembran durchquerende Kette, die für die Bindung des IL-26 verantwortlich ist [49, 50]. IL-10R2, die zweite, kürzere Kette, ist essentiell, um den Komplex zu aktivieren [50]. Erst bildet sich ein binärer Komplex aus IL-26 und IL-20R1, dessen räumliche Anordnung sich durch die Bindung des Interleukins verändert. Danach kann sich die zweite Kette anlagern und aus dem binären einen ternären Komplex formen [50]. Dies bewirkt erneut eine Änderung der Konformation und eine Energiefreisetzung, sodass die in der Reaktionskaskade folgenden rezeptorassoziierten Enzyme aktiviert werden und ihre Substrate umsetzen. Dabei werden die Janus-Tyrosinkinasen 1 und 2 durch IL-20R1 aktiviert [51] und die Tyrosinkinase 2 durch IL-10R2 [47]. Diese Enzyme phosphorylieren dann die

Transkriptionsfaktoren *Signal transducer and activator of transcription 1* und 3 [48, 52].

1.3.3 Wirkung des IL-26

Das IL-26 wirkt auf Keratinozyten, die zu den epithelialen Zellen gehören und den spezifischen IL-26-Rezeptor exprimieren [42]. In Keratinozyten und auch in intestinalen Epithelien stimuliert das IL-26 die Bildung der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-8 [46]. Auf neutrophilen Granulozyten konnte der spezifische IL-26-Rezeptorkomplex in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden [32]. IL-26 erhöht die Chemotaxis dieser Zellen, erniedrigt jedoch die Chemokinese [32]. Eine weitere Zellgruppe, deren Zytokinsynthese durch das IL-26 verstärkt wird, sind die myeloischen Zellen [43]. Rekombinantes humanes IL-26 stimuliert die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-8 aus Monozyten und ist durch eine proinflammatorische Funktion an der Abwehr von Bakterien beteiligt [43]. Ein weiterer Aspekt ist die vermehrte Differenzierung CD4-positiver T-Gedächtniszellen in T_H17-Zellen unter Anwesenheit von mit IL-26 behandelten Monozyten [43]. Humane mononukleare Zellen, unter anderem T-Lymphozyten, die mit dem Herpesvirus Saimiri der Untergruppe C infiziert wurden, zeigen ein kontinuierliches Wachstum [53]. Der Unterschied zwischen den nativen und den veränderten infizierten T-Zellen ist die hohe Produktion von IL-26, deshalb könnte eine weitere Funktion des IL-26 in der Veränderung dieser Zellproliferation liegen [31].

Eine weitere für Interleukine sehr ungewöhnliche Funktion des IL-26 ist das direkte Abtöten von Bakterien, vermutlich indem sich die Proteine zu Oligomeren zusammenlagern und Poren in der Zellwand des Bakteriums bilden [40].

Außerdem kann IL-26 an bakterielle oder freie humane DNA binden. Diese IL-26-DNA-Komplexe können dann in plasmazytoide dendritische Zellen (*plasmacytoid dendritic cells*, pDCs) aufgenommen werden und diese über den TLR9 (*toll-like receptor 9*,) aktivieren. Das wiederum erhöht die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ [40].

IL-26 verknüpft die angeborene mit der erworbenen Immunität: Es kann als Teil der angeborenen Immunität direkt Bakterien töten oder an freie DNA binden und

dadurch pDCs aktivieren, die wiederum Reaktionen des erworbenen Immunsystems anstoßen können.

1.4 Anatomie der Haut

Die wichtigste äußere Barriere des Menschen gegen Infektionen ist die Haut [54]. Mit einer Gesamtfläche von bis zu 2 m² und einem Gewicht von 3,5 – 10 kg ist die Haut das größte Organ des menschlichen Körpers [9]. Die Haut besteht aus mehreren Schichten, um den Körper optimal vor eindringenden Pathogenen zu schützen. Die Schichten heißen, von außen nach innen, Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel. Die Zellen der Epidermis heißen Keratinozyten. Sie schützen den Körper vor mechanischen, thermischen, chemischen und biologischen Einflüssen. In der Epidermis befinden sich kleine, marklose Nervenfasern, jedoch keine Blutgefäße. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt durch Diffusion aus der Dermis [55]. Die Epidermis hat einen vierschichtigen Aufbau, wobei die unterste Schicht Stratum basale genannt wird. Unter physiologischen Bedingungen sind nur die dort vorkommenden rundlichen Keratinozyten in der Lage, sich zu teilen. Je eine Tochterzelle verbleibt im Stratum basale und teilt sich nach 20 Tagen erneut, die andere Tochterzelle wandert innerhalb von vier Wochen an die Oberfläche bis in das Stratum corneum. Dieser Vorgang heißt terminale epidermale Differenzierung und ermöglicht eine rasche Proliferation und die Erneuerung abgenutzter, beanspruchter Haut [9]. Über dem Stratum basale liegt das Stratum spinosum, welches aus größeren Keratinozyten besteht, die über viele Zellkontakte miteinander verbunden sind. Es folgt das Stratum granulosum, dessen Keratinozyten Körnerzellen genannt werden und große Mengen von Keratohyalin granula enthalten. Die Zellen der äußeren Schicht, des Stratum corneum, enthalten keine Zellkerne und haben eine flache, gestreckte Form. Sie werden ununterbrochen abgenutzt und durch neue Zellen aus der untersten Schicht der Epidermis ersetzt. Unterhalb der Epidermis befindet sich eine 0,5 – 1,5 µm breite Basalmembran [55]. Sie verankert Epidermis und Dermis fest miteinander und schränkt den Stoffaustausch ein. Unter der Basalmembran liegt die Dermis, die aus Bindegewebe besteht und in zwei Hautschichten unterteilt wird. Die äußere Schicht heißt Stratum papillare. Die Dermis wölbt sich

wellenförmig in die Epidermis vor und bildet Papillen aus. Darunter liegt das breitere Stratum reticulare. Die Stabilität der Haut wird durch die in der Dermis liegenden Kollagene verstärkt. Zusätzlich bilden elastische Fasern ein feines Netz und sorgen für die Rückbildung von gedehnter Haut. Die Kollagenfasern werden von Fibroblasten synthetisiert. Diese bilden durch ihre langen Fortsätze ein weites Netz. In diesem Netz kommen ruhende Fibrozyten, Lymphozyten, Histiozyten, Mastzellen und die pigmenttragenden Melanozyten vor. In der Dermis gibt es zwei Gefäßplexus. Ein tiefer, an der Grenze zur Subkutis gelegener Plexus wird durch kleine und mittelgroße Arterien und Venen gespeist und gibt viele Arteriolen in die äußeren Hautschichten ab. Im äußeren Bereich entsteht durch Arteriolen, welche sich in die Dermispapillen schlingen, ein oberflächlicher subpapillärer Plexus [9]. Die innerste Schicht ist die Subkutis. Sie enthält vorwiegend Fettzellen und bildet ein weiches Lager für größere Blutgefäße und Nerven. Zudem dient sie dem Schutz für die darunter liegenden Muskeln, Knochen und Organe.

Die anatomischen Eigenschaften der Haut allein stellen keinen ausreichenden Schutz des Organismus gegen die von exogen eindringenden Pathogene dar. Zudem können auch endogene Pathogene durch die Blutgefäße eintreten und die Haut besiedeln. Daher ist ein funktionierendes Immunsystem für den Menschen unerlässlich. Andererseits können aber auch überschießende Immunreaktionen oder Fehler bei deren Regulierung gefährliche Folgen für die Haut haben und diverse Hauterkrankungen hervorrufen. Es konnten in vielen Dermatosen, beispielsweise in der atopischen Dermatitis, der Psoriasis vulgaris oder der Rosazea Fehlregulationen des Immunsystems nachgewiesen werden [56].

1.5 Entzündung

Eine Entzündung ist die Abwehrreaktion der Leukozyten und der Blutgefäße auf pathogene Faktoren, die eine Gewebeschädigung herbeiführen können [57].

Zu den pathogenen Faktoren zählen neben Bakterien, Viren, Würmern und Pilzen auch chemische und physikalische Einflüsse [2]. Auch viele exogene Moleküle oder körperfremde Zellen können eine Immunantwort auslösen [29]. Eine Entzündung entsteht, wenn aktivierte Gewebsmakrophagen, die

Histiozyten, Zytokine ausschütten [29]. Lokale Zeichen einer Entzündung sind Rötung (lat.: *rubor*), Überwärmung (lat.: *calor*), Schwellung (lat.: *tumor*), Schmerz (lat.: *dolor*) und eine eingeschränkte Funktion (lat.: *functio laesa*) [2]. Das Ziel der Entzündung ist die Beseitigung der Noxen sowie die Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebezustands [57]. Wenn sich die Mikroorganismen oder Fremdmaterialien nicht entfernen lassen beziehungsweise sich das Immunsystem beispielsweise im Rahmen einer Autoimmunkrankheit gegen sich selbst richtet, entsteht im Gewebe eine chronische Entzündung mit vielen Histiozyten, Lymphozyten und Plasmazellen [57]. Durch verstärkte Angiogenese geht eine chronische Entzündung mit einer gesteigerten Durchblutung einher. Zudem kommt es zu einer erhöhten Produktion kollagenen Gewebes durch Fibroblasten [57].

In einer akuten Entzündung entsteht erst durch reaktive Vasokonstriktion eine temporäre Minderdurchblutung, gefolgt von einer Abnahme des Gefäßtonus und Verlangsamung des Blutflusses. Dadurch steigt der intravasale Druck und die Gefäßpermeabilität steigt, sodass die Öffnungen zwischen den Endothelzellen größer werden und ein Exsudat entsteht [57]. Während unter physiologischen Bedingungen nur Wasser und gelöste Ionen passiv das Endothel durchqueren können, ist dies im Falle einer akuten Entzündungsreaktion auch Plasmaproteinen und Erythrozyten möglich, wodurch im Gewebe Ödeme und Durchblutungsstörungen entstehen können [29, 57]. Als Antwort auf die hieraus resultierende Hypoxie und auf Ernährungsdefizite, stimulieren Zellen das Endothel der Blutgefäße zur Proliferation [58-61]. Durch die Gewebhypoxie entstehen metabolische Störungen. Es kann nicht mehr genügend Adenosintriphosphat (ATP) produziert werden, die ATP-abhängigen, membrangebundenen Transportsysteme funktionieren nicht und die Zellen sind auf anaerobe Glykolyse angewiesen [57]. Weil den Zellen der Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung fehlt, wird das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, in Milchsäure umgewandelt. Dies wiederum führt zu einer Azidose [29, 57].

1.6 Thioredoxin und Thioredoxinreduktase

Eines der wichtigsten Reduktions-Oxidationssysteme des menschlichen Körpers ist das System aus Thioredoxin (TXN) und Thioredoxinreduktase 1 (TXNRD1) [62]. Reduktions- und Oxidationsreaktionen gehören zu den wichtigsten chemischen Reaktionen zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Eine Oxidation ist eine Elektronenabgabe, eine Reduktion eine Elektronenaufnahme [63]. TXN ist ein kleines, aus 104 Aminosäuren bestehendes, im Zytoplasma oder in den Mitochondrien vorkommendes Redoxprotein, das ubiquitär vorhanden ist [64-67]. Bei Entzündungen und Infektionen wird es verstärkt synthetisiert [67]. Das TXN kann, indem es selbst oxidiert wird, Elektronen an andere Moleküle abgeben und deren Reaktionsfreudigkeit erhöhen. Dafür besitzt es eine bestimmte Abfolge aus Aminosäuren [65]:

– Tryptophan – **Cystein** – Glycin – Prolin – **Cystein** –

Die Strukturformel der Aminosäure Cystein ist in Abb. 1 dargestellt. Die Sulfhydrylgruppen der zwei Cysteine des TXN werden oxidiert, während Cysteine eines anderen Moleküls reduziert werden. Damit das TXN erneut funktionsfähig wird, werden die oxidierten Cysteine des TXN von der TXNRD1 reduziert, wobei Wasserstoffatome durch Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) geliefert werden [65].

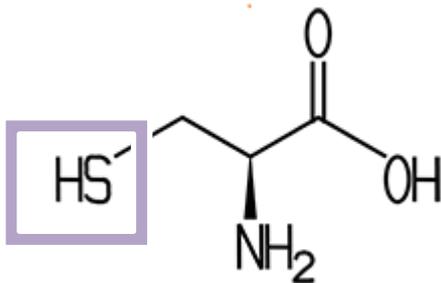


Abb. 1: Darstellung der Strukturformel der Aminosäure Cystein. Im Rahmen befindet sich hervorgehoben ihre Sulfhydrylgruppe [63].

Die TXNRD1 ist ein antioxidatives, Selenium enthaltendes Enzym [68]. Sie gehört zur Familie der Nukleotiddisulfid-Oxidoreduktasen und ihre wichtigste, bekannte Funktion ist die Reduktion von TXN-Disulfid zu TXN [69]. Für diese

Reaktion wird NADPH benötigt [69]. Das Ziel ist es, eine zelluläre Homöostase zwischen reduzierenden und oxidierenden Bedingungen zu schaffen [70]. Es existieren 3 Subtypen des Enzyms: TXNRD1, 2 und 3 [71]. Alle haben Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptose sowie auf die Transformation der Gewebe als Antwort auf ein verändertes Milieu [72].

1.7 Rosazea

Die Rosazea ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung [73]. Im zentralen Gesichtsbereich der PatientInnen entstehen Erytheme, Teleangiektasien, Papeln, Pusteln und ein Lymphödem [74]. Der psychische Leidensdruck der Betroffenen ist aufgrund der Lokalisation der Hautveränderungen sehr hoch. Unter der Rosazea leidet in Deutschland 2,3 % der arbeitenden Bevölkerung [75]. Bei 80 % der Betroffenen treten die ersten Symptome im mittleren Erwachsenenalter mit einem Gipfel zwischen dem 40. und dem 50. Lebensjahr auf [76, 77].

Das klinische Bild ist sehr heterogen und es werden vier Subtypen unterschieden [25]. Der Subtyp 1, die erythematös-teleangiektatische Rosazea, wird charakterisiert durch persistierende oder wiederkehrende Erytheme im zentralen Gesichtsbereich [78]. Beim zweiten Subtyp, der papulopustulösen Rosazea, dominieren eine permanente Hautrötung sowie schmerzende Papeln und Pusteln (s. Abb. 2, A). Weitere Ausprägungen sind Subtyp 3, die phymatöse Rosazea mit Hautverdickung und Knotenbildung (s. Abb. 2, B) sowie Subtyp 4, die okuläre Rosazea mit entzündlich bedingter Beeinträchtigung der Augen [79, 80].

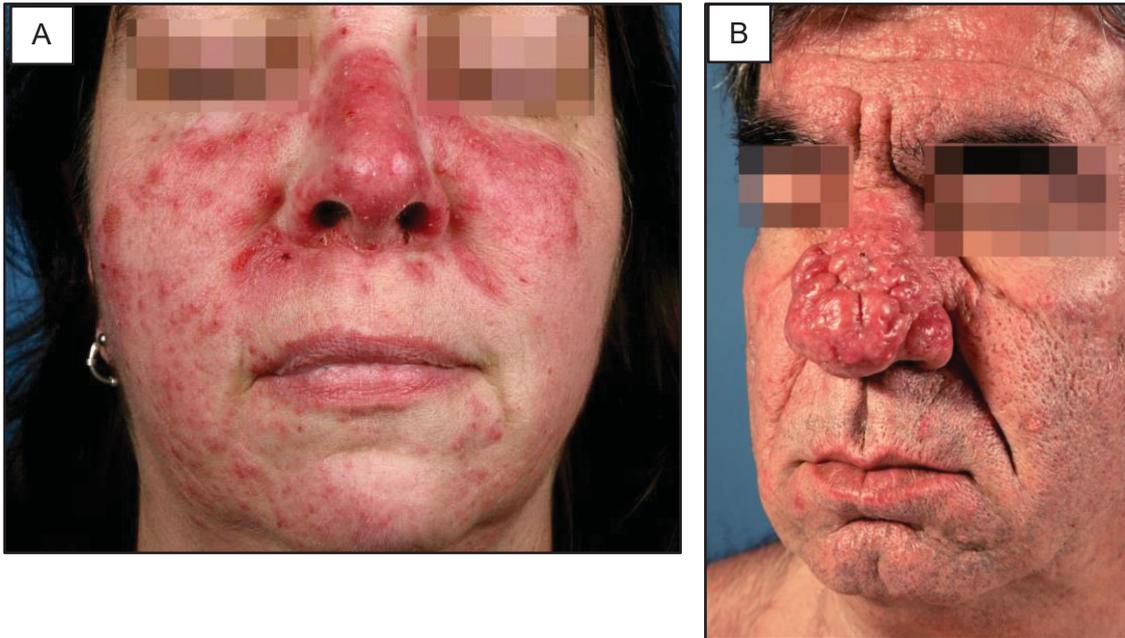


Abb. 2: Subtyp 1 (Rosacea papulopustulosa, A) und Subtyp 3 (phymatöse Rosacea / Rhinophym, B). ©Universitätsklinikum Düsseldorf

Bei histopathologischer Untersuchung der Rosacea dominieren hypertrophierte elastische Fasern, dilatierte Blutgefäße und perivaskuläre sowie perifollikuläre lymphohistiozytäre Infiltrate [74]. Die lymphohistiozytären Infiltrate bestehen aus Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Vereinzelt werden Mikroabszesse aus neutrophilen Granulozyten und das Vorkommen großer Mengen von Mastzellen beschrieben [81]. Weder die Ätiologie oder Genetik noch die Pathogenese der Rosacea sind vollständig bekannt. Die bisherigen Forschungsergebnisse zur Pathogenese lassen sich in fünf Pfade einteilen [25, 82]:

1. Erhöhte Dichte angeborener neuronaler Hautrezeptoren
2. Neurovaskuläre Veränderungen
3. Ungleichgewicht des Immunsystems
4. Entzündungsaktivierung
5. Cathelicidin-induzierte Entzündung

1.7.1 Erhöhte Dichte angeborener neuronaler Hautrezeptoren

Bei PatientInnen mit Rosazea lässt sich eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber physiologischen, biologischen und endogenen Reizen feststellen. Zu den physiologischen Reizen zählen die Temperatur, beispielsweise heißes Duschen [83] oder heiße Getränke [84], aber auch Alkoholkonsum [85], scharfe Speisen [86], Rauchen [87] und UV-Strahlung. UV-Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 320 und 400 Nanometer (nm) heißt UVA und durchdringt die Haut bis unter die Dermis [88, 89]. Im Wellenlängenbereich von 280 bis 320 nm heißt sie UVB und dringt nur in die Epidermis ein [88, 89]. Durch diese Strahlung entsteht in der Haut oxidativer Stress und es werden reduzierende Enzyme benötigt, um den Zelltod durch Apoptose zu vermeiden. Biologische Reize spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese, so wurde in der Gesichtshaut von PatientInnen mit Rosazea im Vergleich zur Gesichtshaut von gesunden ProbandInnen häufiger die Milbe *Demodex folliculorum* nachgewiesen [90, 91]. Dabei handelt es sich um einen Parasiten der Infundibuli der Haarfollikel, welcher sich von den Produkten der Talgdrüsen ernährt [92]. Durch eine hohe Dichte der Milben entstehen beispielsweise bei Immunsuppression der Akne ähnliche Effloreszenzen und Follikulitiden [92]. Es bedarf weiterer Forschung, um herauszufinden, ob die Milben die Rosazea triggern, oder ob bei PatientInnen mit Rosazea ein Immundefekt besteht und dadurch ein für die Milben passendes Milieu geschaffen wird [73].

Zu den endogenen Reizen zählen emotionaler Stress und eine genetische Prädisposition. Die erhöhte Empfindlichkeit der PatientInnen gegenüber physiologischen, biologischen und endogenen Reizen lässt sich auf eine Überexpression kutaner Rezeptoren zurückführen, deren Stimulierung eine Aktivierung des TLR2 bewirkt [93]. TLR2 ist ein PRR der Zellmembran von Keratinozyten, Makrophagen und Mastzellen und reagiert auf extrazelluläre pathogen- oder verletzungsassoziierte molekulare Muster mit der Aktivierung einer Entzündung durch Initiierung der Synthese von Entzündungsmediatoren wie NFκB, Zytokinen und Cathelicidinen [94]. Die erhöhte Sensibilität gegenüber den Reizen durch Hochregulation der Rezeptoren ist ein erster Mechanismus zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Rosazea.

1.7.2 Neurovaskuläre Veränderungen

Auch zunächst flüchtige, im weiteren Krankheitsverlauf persistierende und bei vermehrter Durchblutung oder Sport zunehmende Erytheme sowie permanente Teleangiektasien weisen darauf hin, dass Gefäßveränderungen bei der Pathogenese der Rosazea ursächlich sein könnten.

Es konnten Auffälligkeiten der dermalen Blutgefäße nachgewiesen werden, denn während der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und seine Rezeptoren in gesunder Haut nur in der Epidermis und in direkter Nachbarschaft zu Drüsen nachgewiesen werden konnten, kommen diese Proteine in der Rosazea auch im Endothel der Hautgefäße vor [97]. VEGF induziert eine verstärkte Angiogenese und führt somit zu einer gesteigerten Durchblutung sowie zu Erythemen [98]. Es konnte sowohl eine vermehrte Anzahl an Blutgefäßen als auch eine Vasodilatation nachgewiesen werden [90, 95]. Durch die gesteigerte Dichte sensorischer Neurone in der Rosazea werden Neurotransmitter ausgeschüttet, die eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid, einem potenten Vasodilatator des Endothels, bewirken [95].

1.7.3 Ungleichgewicht des Immunsystems

Nicht nur die exogenen und neuronalen Einflüsse, sondern auch eine Fehlregulation des Immunsystems könnte ursächlich an der Entstehung der Rosazea beteiligt sein. In allen Subtypen der Rosazea konnte ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu gesunder Haut beobachtet werden, insbesondere im Subtyp der papulopustulösen Rosazea [95, 96]. Auch konnten in allen Stadien der Rosazea, im Vergleich zu gesunder Haut, vermehrt CD4-positive T-Helferzellen, im Speziellen T_H1- und T_H17-Zellen sowie deren Zytokine IFN- γ und TNF- α , nachgewiesen werden [96, 97].

1.7.4 Entzündungsaktivierung

Neben einer erhöhten Anzahl der proinflammatorischen Immunzellen konnten in der Rosazea auch erhöhte Mengen der Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden. So ist das IL-1 β hochreguliert, welches zu einer Ausschüttung von IL-8

führt und die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, die Produktion von TNF und einer Vielzahl weiterer proinflammatorischer Proteine und somit den Entzündungsprozess fördert und ein hochinflammatorisches Milieu erschafft [91, 98]. Auch die Aktivierung von Mastzellen und die Ausschüttung weiterer Zytokine erhöht die Entzündungsreaktion durch Vasodilatation und Angiogenese, das Entstehen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und weiterer Gewebeschäden mit erhöhter Vasopermeabilität, Ödembildung und Fibrose [99-101].

1.7.5 Cathelicidin-induzierte Entzündung

Ein fünfter beschriebener Pfad der Pathogenese der Rosazea ist die Dysfunktion der epidermalen Proteasen und die daraus resultierende verstärkte Aktivierung des Cathelicidins LL-37, welches nach Aktivierung bestimmter TLR freigesetzt wird und in der Rosazea signifikant erhöht ist (s. Kapitel 1.2.2.) [102-104]. LL-37 wurde in verletzter Haut, in Granulationsgewebe und auch in der Haut anderer chronisch-entzündlicher Krankheiten, wie der Psoriasis, vermehrt nachgewiesen [105, 106]. Da es Auswirkungen auf die Chemotaxis der Leukozyten, die Angiogenese und die extrazelluläre Matrix hat, könnte es die entzündlichen Prozesse der Rosazea triggern [23, 24, 26]. Außerdem erhöht es die Freisetzung des Entzündungsmediators IL-8 durch Keratinozyten [25]. Das LL-37 kann zudem sowohl mit freier DNA Komplexe bilden, als auch durch Makrophagen phagozytierte Bakterien eliminieren [27, 28]. Ein Ungleichgewicht zugunsten der Produktion und Aktivierung des LL-37 könnte an der Pathogenese der Rosazea beteiligt sein.

1.7.6 Therapie der Rosazea

Bisher gibt es keine kausale Therapie der Rosazea. Es bestehen viele mögliche Behandlungsalternativen, beispielsweise die topische Anwendung von Ivermectin, Azelainsäure, Metronidazol oder Brimonidin sowie die orale Einnahme von Tetracyclinen [82]. Zunächst wird allen PatientInnen ein Erweichungsmittel sowie ein konsequenter Sonnenschutz empfohlen, um die Hautbarriere zu schützen [107]. Ivermectin wirkt einerseits antiparasitär, indem es Glutamat- und γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren bindet und durch dauerhaft geöffnete Ionenkanäle der Motoneurone eine Paralyse der *Demodex folliculorum*

bewirkt, hat jedoch andererseits eine antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung des Entzündungsmediators NFκB [108]. Azelainsäure hemmt ebenfalls NFκB [107] und Metronidazol hemmt die Herstellung von ROS [74]. Brimonidin vermindert das Erythem der PatientInnen, indem es an alpha-2-Adrenorezeptoren auf glatten Muskelzellen bindet und eine lokale Vasokonstriktion bewirkt [109]. Die Externa haben zwar eine symptomlindernde Wirkung, ihr Wirkmechanismus ist jedoch nicht gänzlich erforscht und nach Absetzen der Therapie nehmen die Symptome oftmals wieder zu [74]. Bei besonders starken Verläufen kann ergänzend zur topischen eine systemische Therapie angewendet werden. Für die orale Einnahme sind Tetrazykline zugelassen und bei papulopustulöser Rosazea bewirkt Doxycylin laut Studien eine Verringerung der Läsionen, indem es immunsuppressiv wirkt und als Transkriptionsfaktor die Angiogenese inhibiert [107]. Unterstützend wird das strikte Vermeiden der Exazerbationsfaktoren empfohlen und den PatientInnen eine Schulung in gezielter, abdeckender Kosmetik angeboten [74].

1.8 Ziele der Arbeit

Die Rosazea ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung mit Erythemen, Teleangiektasien und Pusteln im zentralen Gesichtsbereich, deren Pathogenese bisher nur ansatzweise erforscht ist:

Es wird diskutiert, dass eine erhöhte Dichte angeborener neuronaler Hautrezeptoren, neurovaskuläre Veränderungen, ein Ungleichgewicht des Immunsystems, eine Entzündungsaktivierung sowie die Cathelicidin-induzierte Entzündung eine pathogenetische Rolle spielen könnten.

In der Dermis betroffener Hautareale entstehen entzündliche Immunzellinfiltrate um vergrößerte Blutgefäße und Haarfollikel, die aus Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bestehen. In allen Stadien der Rosazea konnte außerdem eine signifikant erhöhte Anzahl an T_H1- und T_H17-Zellen detektiert werden. Die T_H17-Zellen können das IL-26 produzieren, ein Interleukin mit antimikrobiellen Eigenschaften.

Das IL-26 ist, genauso wie das LL-37, in der Lage, an DNA zu binden und dadurch weitere Immunzellen zu aktivieren. Da die T_H17-Zellen in der Rosazea vermehrt vorkommen und Keratinozyten den IL-26-Rezeptor exprimieren, stellt

sich die Frage, ob das IL-26 in der Rosazea eine wichtige pathogenetische Rolle spielen könnte.

Ein anderes antimikrobielles Peptid, das DEFB1, weist unter reduzierenden Bedingungen eine deutlich erhöhte Aktivität auf und tötet Bakterien effizienter ab. Durch die reduzierenden Bedingungen werden Disulfidbrücken aufgespalten und in der Folge ändert sich die Struktur des DEFB1. Daraus leitet sich eine weitere Fragestellung ab: Haben reduzierende Bedingungen Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität des IL-26, welches ebenfalls Disulfidbrücken besitzt?

Durch die gesteigerte Aktivität der Immunzellen in einer Entzündungsreaktion wie der Rosazea, steigt dort auch der Sauerstoffbedarf. Es kommt zu einem Sauerstoffdefizit. Vermutlich herrschen daher in dem betroffenen Hautbereich reduzierende Bedingungen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Expression des physiologischen Redoxsystems, bestehend aus TXN und TXNRD1, in der Rosazea untersucht.

Die Ergebnisse zu IL-26 und dem Einfluss der reduzierenden Bedingungen auf die Bindung an die DNA sowie zu TXN und TXNRD1 in der Rosazea, werden die Grundlage für die weitere Forschung am IL-26 unter verschiedenen (patho-)physiologischen Bedingungen darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 PatientInnen und gesunde ProbandInnen

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 4028 genehmigt. Alle verwendeten Hautstanzbiopsien gesunder Haut sowie ein Teil der Stanzbiopsien von PatientInnen mit Rosazea stammten von PatientInnen der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf. Elf weitere Proben der Rosazea wurden aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums CHUV in Lausanne in der Schweiz von Dr. Curdin Conrad übermittelt. Auf eigenen Wunsch und auf Anraten des behandelnden Arztes wurden den PatientInnen Stanzbiopsien entnommen, um eine histologische Aufklärung der Hautveränderung zu ermöglichen. Dabei wurden unter Zustimmung der PatientInnen diagnostisch nicht relevante Probenanteile für investigative Zwecke umgehend bei – 80 °C tiefgefroren.

Diese Studie schließt 56 Hautproben ein. Bei diesen Proben handelt es sich um 28 Proben gesunder Haut von ProbandInnen und 28 an Rosazea erkrankten Personen, deren Verteilung in Tabelle 1 dargestellt wird. Alle PatientInnen sind Kaukasier.

Alter (gesamt) :	
Mittelwert (Jahre):	69
Spannbreite (Jahre):	29-95
Geschlecht (gesamt):	
Gesamt:	56
Weiblich : Männlich-Verhältnis:	29:27
Weiblich (%); Männlich (%):	51,79 %; 48,21 %

Gesunde Haut:	
Anzahl:	28
Mittleres Alter:	76
Weiblich (%); Männlich (%):	64,29 %; 35,71 %
Rosazea:	
Anzahl:	28
Mittleres Alter:	61
Weiblich (%); Männlich (%):	39,29 %; 60,71 %

Tabelle 1: Verteilung der PatientInnen und der gesunden ProbandInnen

In Abb. 3 wird die Altersverteilung der PatientInnen mit Rosazea dargestellt. Das mittlere Alter dieser Gruppe liegt bei 61 Jahren und die jüngste hautpendende Person war zum Zeitpunkt der Entnahme 29, die älteste Person 85 Jahre alt.

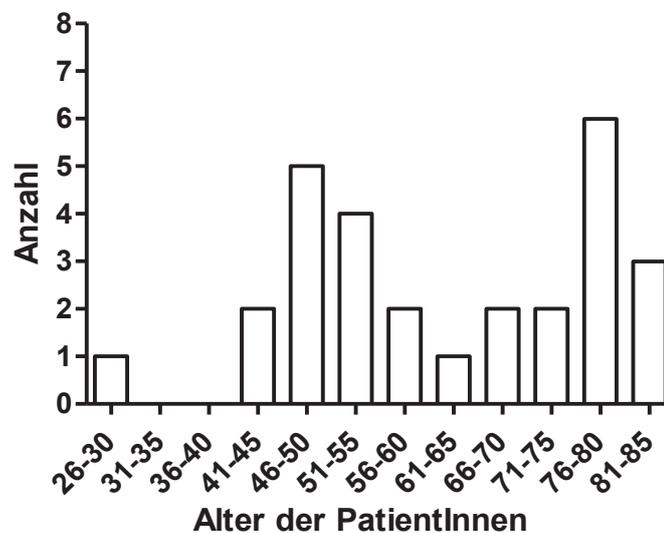


Abb. 3: Alter der PatientInnen mit Rosazea. Darstellung der PatientInnen mit Rosazea. Das mittlere Alter beträgt 61 Jahre, dabei ist das Mindestalter 29 und das Höchstalter 85 Jahre.

2.2 mRNA-Expressionsanalysen

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (*quantitative polimerase chain reaction*, qPCR) ist eine sehr sensitive Methode, um geringste Mengen an Boten-

Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) zu detektieren [39]. Da mRNA nicht als Vorlage für eine qPCR dienen kann, muss die mRNA zuerst durch umgekehrte Transkription in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) umgeschrieben werden. Diese wird dann im zweiten Schritt in einer qPCR exponentiell amplifiziert. Die Trennung dieser zwei Schritte hat den Vorteil, dass eine stabile Menge an cDNA generiert werden kann und eine langfristige Lagerung möglich ist [39]. Auch können aus der gleichen cDNA mehrere qPCRs mit verschiedenen Primern durchgeführt werden, um die Menge unterschiedlicher Proteine in derselben Probe zu erforschen.

2.2.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde unter Verwendung eines RNeasy Mini Kits (Qiagen, Deutschland) nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Bevor das RNeasy Mini Kit zum Einsatz kam, wurde zuerst zu jeder Hautprobe 1 ml Trizol (TRIzol, Life Technologies, USA) pipettiert. Mithilfe eines Homogenisators (POLYTRON PT 2500 E, Kinematica AG, Schweiz) wurden die Gewebestücke zerkleinert und homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Lysate 15 s gemischt und dann 15 min bei 4 °C mit maximaler Leistung (500 W) zentrifugiert. Danach wurden die wässrigen Phasen in neue Gefäße überführt und zu jedem Lysat 600 µl 70 % Ethanol pipettiert und mit dem Hersteller-Protokoll des RNeasy Mini Kits begonnen. Nach Umfüllen von 700 µl jeder Probe auf RNeasy Mini Säulen, wurden die Reaktionsgefäße 15 s bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (*Rotations per minute*, rpm) zentrifugiert. Die Säulen wurden auf neue Sammelgefäße gesteckt. Nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer wurde erneut 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. RW1-Puffer ist ein Bestandteil des RNeasy Mini Kits und enthält neben Guanidinsalzen auch Ethanol. Er eliminiert als Waschpuffer Carboanhydrasen, Proteine und Fettsäuren. Nachdem die wässrige Phase nochmals verworfen und die Säulen auf neue Sammelgefäße gesteckt wurden, wurde auf jede Säule 500 µl RPE-Puffer pipettiert. Die Proben wurden erneut 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der RPE-Puffer ist ein Waschpuffer mit einem hohen Ethanolgehalt und entfernt die Salze, die nach Gebrauch des RW1-Puffers auf der Säule verblieben sind.

Danach wurden die Säulen auf neue Sammelgefäße gesteckt und erneut wurde 500 µl RPE-Puffer auf jede Säule pipettiert. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNeasy Silikon-Gelmembran zu trocknen. Die Säulen verblieben in der Zentrifuge, die für 1 min auf die höchste Geschwindigkeit, 13200 rpm, eingestellt wurde. Zum Ausspülen wurde jede RNeasy Säule auf ein weiteres 1,5 ml fassendes Sammelgefäß gesteckt. Nun wurde 50 µl RNase freies Wasser direkt auf die Silikon-Gelmembran pipettiert. Es folgten eine 3 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) sowie eine 1 min Zentrifugation bei 10.000 rpm. Abschließend wurde die Konzentration der RNA mittels Spektrophotometrie (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, USA) gemessen.

2.2.2 cDNA-Synthese mittels reverse Transkriptase PCR

Durch diesen Schritt wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Der erste DNase-Ansatz wurde in einem 1,5 ml fassenden Polypropylenröhrchen in Anlehnung an Tabelle 2 hergestellt. Die benötigte Menge war abhängig von der Anzahl der umzuschreibenden RNA-Proben. Der DNase Mix wurde dabei als letztes hinzugegeben.

Ansatz 1	1x	16x	30x
First strand buffer (Invitrogen, USA)	1,5	24	45
RNase Inhibitor (Promega Corporation, USA)	1	16	30
DNase Mix (Roche, Mannheim, Deutschland)	1	16	30
Wasser	2,5	40	75

Tabelle 2: Mengenverhältnisse (in µl) der für Ansatz 1 benötigten Reagenzien.

Die isolierte RNA wurde auf 0,4 µg/µl verdünnt oder unverdünnt verwendet, falls diese Konzentration nach der vorherigen RNA-Isolation nicht überschritten worden war. In die beschrifteten Gefäße wurden 6 µl der DNase-Lösung 1 pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl der isolierten RNA wurde durch Pipettieren gemischt und kurz zentrifugiert. Danach wurden die Proben im Thermocycler (T300 ThermoCycler, Biometra, Deutschland) 20 min bei 37 °C, dann 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Währenddessen

wurden die Ansätze 2 und 3 angesetzt. Deren Zusammensetzung ist den folgenden Tabellen (Tabelle 3 und Tabelle 4) zu entnehmen:

Ansatz 2	1x	16x	30x
Oligo dT (Invitrogen, USA) 16-18 Primer	1	16	30
Random Hexamer Primer (Promega, USA)	0,4	6,4	12
Wasser	2,6	41,6	78

Tabelle 3: Mengenverhältnisse (in µl) der für Ansatz 2 benötigten Reagenzien.

Ansatz 3	1x	16x	30x
First strand buffer (Invitrogen, USA)	4,5	72	135
dNTP	1,5	24	45
DTT (Invitrogen, USA)	1	16	30
RNAsin (Promega, USA)	0,5	8	15
Wasser	1,5	24	45
SuperScript	1	16	30

Tabelle 4: Mengenverhältnisse (in µl) der für Ansatz 3 benötigten Reagenzien.

Nach dem Zentrifugieren wurden zunächst 4 µl des zweiten Ansatzes dazu pipettiert und dann erneut gemischt und kurz zentrifugiert. Dann wurden die Proben ein zweites Mal in den Thermocycler gesteckt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach kurzem Kühlen auf 4 °C wurden 10 µl des Ansatzes 3 hinzugegeben. Wieder wurde kurz gemischt und zentrifugiert und der Thermocycler wurde ein drittes Mal genutzt. Das Gerät erwärmte die Proben 50 min auf 42 °C und 10 min auf 70 °C, bevor sie auf 4 °C gekühlt wurden. Schließlich wurde zu den Proben, je nachdem, wie hoch die RNA-Konzentration zu Beginn war, maximal 370 µl Wasser pipettiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C eingefroren.

Die cDNA wurde nach der Herstellung auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen und jeweils mit Wasser im Verhältnis eins zu vier verdünnt und ebenfalls bis zum Gebrauch bei – 20 °C eingefroren.

2.2.3 qPCR

Bei der Durchführung einer qPCR werden zu der cDNA vorwärts und rückwärts verlaufende Primer (s. Tabelle 5) sowie die verschiedenen Nukleosidtriphosphate und eine hitzestabile Polymerase hinzugegeben.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Länge	Farbstoff
TXN vorwärts	tggtgtgggccttgcaaaatga	22	SYBR Green
TXN rückwärts	ttcaccacacctttgtcccttc	22	SYBR Green
TXNRD1 vorwärts	tgaggagaaagctgtggagaa	21	SYBR Green
TXNRD1 rückwärts	ccattccaatggccaaaa	18	SYBR Green
GAPDH vorwärts	acgcatttggctgtattggg	20	SYBR Green
GAPDH rückwärts	tgattttggagggatctcgc	20	SYBR Green
Oligoname	TaqMan® Assay		Farbstoff
<i>IL26</i>	Hs00218189_m1		TaqMan

Tabelle 5: In den qPCRs verwendete Primerpaare.

Durch Erhitzen auf 96 °C denaturieren die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA. An die entstehenden Einzelstränge lagern sich im nächsten Schritt bei 70 °C die Primer an und eine Polymerase synthetisiert die komplementären Stränge. Durch erneutes Erhitzen werden die Stränge wieder voneinander getrennt und die Primer können sich erneut anlagern, sodass ein weiterer Amplifikationszyklus beginnt und die Menge der cDNA exponentiell ansteigt. Je mehr cDNA am Anfang vorhanden ist, desto schneller steigt die synthetisierte Menge an und überschreitet einen im Voraus festgelegten Schwellenwert.

In Abb. 4 wird beispielhaft dargestellt, dass in läsionaler Haut von PsoriatikerInnen mehr *IL-26* enthalten ist als in gesunder Haut von ProbandInnen.

Mit jeder cDNA wurden eine TaqMan qPCR mit *IL-26* und mehrere SYBR Green qPCRs mit den oben angegebenen Primern der zu untersuchenden Proteine durchgeführt sowie jeweils eine SYBR qPCR mit Primern für das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*). Dieses Enzym wird im Zytoplasma jeder Zelle für die Glykolyse benötigt und synthetisiert. *GAPDH* dient als Referenzgen, um den Gehalt jeder Probe relativ zu quantifizieren und damit

zu ermöglichen, die Ergebnisse der qPCRs der einzelnen Proben miteinander zu vergleichen. Bei allen qPCRs wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet und die jeweilige qPCR mittels des QuantStudio 6-qPCR-Geräts (Applied Biosystems by Life Technologies, USA) gemessen. Die Methoden für die TaqMan und SYBR Green qPCRs unterschieden sich nur in den Mengen der eingesetzten Substanzen sowie in den verwendeten Mastermixen (Tabelle 6).

Reagenz	Inhalt	Firma	Katalognr.
Power SYBR® Green PCR Master Mix	5 ml	Applied Biosystems, GB	4367659
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	5 ml	Applied Biosystems, GB	4318157

Tabelle 6: in den qPCRs verwendete Mastermixe.

Für jede qPCR wurde eine *MicroAmp Optical 96-well reaction plate* (Applied Biosystems by Life Technologies, USA) verwendet. Die synthetisierte cDNA (s. Kapitel 2.2.2.) wurde nochmals im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 10 µl der cDNA sowie 10 µl destilliertes Wasser als Negativkontrolle benötigt. Um die SYBR Green qPCR durchzuführen, wurden je Probe 12,5 µl SYBR Mastermix und 2,5 µl vom jeweiligen Primermix dazugegeben. Für die TaqMan qPCR wurden 10 µl 2x TaqMan Mastermix sowie 1 µl GAPDH-mix benötigt. Zuerst wurden die Primer- und Mastermixe miteinander zu Finalmixen vermengt und auf die *MicroAmp Optical 96-well reaction plate* aufgetragen. Die vorverdünnte cDNA wurde hinzugegeben und die ganze Platte 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

2.3 Verarbeitung von Gewebeproben und Durchführung eines ELISA

Im ersten Schritt wurden die bei – 80 °C tiefgefrorenen Gewebeproben homogenisiert. Im zweiten Schritt wurde ein *Protein Assay* (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt, um den Proteingehalt jeder einzelnen Probe zu bestimmen. Die Proben wurden dann alle auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml Gesamtprotein verdünnt. Im dritten und damit letzten Schritt wurde ein *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

durchgeführt, um die Konzentration an IL-26 oder TXN in jeder Probe zu bestimmen.

2.3.1 Homogenisierung von Hautbiopsien

Die Hautproben wurden aus dem Gefrierschrank ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) in flüssigen Stickstoff überführt. Für jede Probe wurden ein 5 ml Falcon Reaktionsgefäß (*Sterile Round Bottom Tube*, BD Biosciences, USA) und zwei 1,5 ml sogenannte *Protein LoBind Tubes* (Eppendorf, Deutschland) benötigt. In die 5 ml Falcon Gefäße wurden zuerst je 1 ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphate buffer saline*: PBS; Dulbecco, Biochrom GmbH, Deutschland) mit zusätzlich 1 mM Natriumchlorid (NaCl) gegeben, bevor die PatientInnenproben aus dem Stickstoff überführt werden konnten. Die Zugabe von NaCl zum PBS sollte die Ausbildung intermolekularer Bindungen zwischen anionischen und kationischen Molekülen vermeiden. Des Weiteren wurde in jedes Falcon 1 μl Proteaseinhibitor (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Merck Millipore, USA) gegeben, um freigesetzte Enzyme an der Proteinspaltung zu hindern. Zu Beginn der Homogenisierung sowie zwischen den einzelnen Proben wurde das Messer des Homogenisators (PT 2500, E, Kinematica, Schweiz) gereinigt, indem es nacheinander in drei verschiedenen 50 ml Falcon Gefäßen kurz angeschaltet wurde. Das erste Gefäß enthielt destilliertes Wasser, das zweite Ethanol und das dritte nochmals destilliertes Wasser. Mithilfe des Homogenisators wurden die Proben zerkleinert, bis keine Gewebestückchen mehr sichtbar waren und ein homogenes Gemisch entstand. Die Proben wurden auf Eis zwischengelagert. Danach wurden alle Homogenisate in die 1,5 ml *Protein LoBind Tubes* überführt. Um etwaige Proteinverluste zu vermeiden, wurden die Reste im 5 ml Falcon Gefäß mit 500 μl PBS-NaCl ausgespült und auch in die *Protein LoBind Tubes* transferiert. Damit eventuelle feste Bestandteile sowie Fette eliminiert werden konnten, folgte eine 5 min Zentrifugation bei 7300 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wurde in neue *Protein LoBind Tubes* überführt und für eine kurzzeitige Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.3.2 Pierce BCA Protein Assay

Für dieses Experiment wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) genutzt. Dieses enthielt die *Pierce BCA Protein Assay* Reagenzien A und B sowie eine Albumin Standardlösung. Das Ziel dieser Methode war es, die in der Gewebelösung vorhandene Proteinmenge mithilfe von Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) zu quantifizieren. BCA ist eine Dicarbonsäure, die zwei Carbonylgruppen besitzt. Zwei dieser BCA-Moleküle können mit einem einwertigen Kupferion einen violetten Komplex bilden. Die Bicinchoninsäure dient somit als Indikator für die Konzentration an Kupferionen in der Lösung. Bei einer Wellenlänge von 562 nm haben die Komplexe ein Absorptionsmaximum und lassen sich dort quantitativ nachweisen. Da Proteine aus Aminosäuren bestehen, von denen einige, namentlich Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin, in der Lage sind, zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen zu reduzieren, entsteht bei hohem Proteingehalt viel einwertiges Kupfer und es bilden sich viele Komplexe aus je einem Kupfer und zwei Molekülen Bicinchoninsäure. Dies führt wiederum zu einem verstärkten Farbumschlag des Indikators. Die Voraussetzung für dieses Experiment war die Berechnung der benötigten Menge an Arbeitsreagenz (*working reagent*, WR), das für die Komplexbildung notwendig war. Um die WR herzustellen, wurden das Reagenz A, bestehend aus einer Salzlösung mit Karbonat und Hydrogenkarbonat als Puffer sowie das 4 % Kupfersulfat enthaltende Reagenz B, miteinander vermischt. Das Verhältnis von A zu B sollte 50:1 sein. Die Gesamtmenge an Reagenz A wurde wie folgt berechnet:

$$(\# \text{ Standards} + \# \text{ Proben}) \times (\# \text{ Replikate}) \times (\text{Volumen des WR pro Probe}) = \text{Volumen des Reagenzes A}$$

Dies entspricht am Beispiel von 6 PatientInnenproben $(9 + 6) \times 2 \times 0,2 \text{ ml} = 6 \text{ ml}$. Reagenz A und B wurden demnach beispielsweise in einem Mengenverhältnis von 6,5 ml zu 130 μl gemischt. Um die spätere Absorption standardisiert vergleichen zu können, war im Pierce BCA Protein Assay Kit eine Standardlösung enthalten, welche nach dem Schema in Tabelle 7 auf verschiedene Konzentrationen verdünnt werden musste. Es handelte sich um Albumin aus dem Serum von Rindern (*Bovine Serum Albumin*, BSA).

Name	Verdünnungs- volumen (µl)	Volumen und Quelle des BSA (µl)	BSA- Endkonzentration (µg/ml)
A	0	300 der Standardlösung	2000
B	125	375 der Standardlösung	1500
C	325	325 der Standardlösung	1000
D	175	175 der Lösung B	750
E	325	325 der Lösung C	500
F	325	325 der Lösung E	250
G	325	325 der Lösung F	125
H	400	100 der Lösung G	25
I	400	0	0

Tabelle 7: Verdünnungsschema der Standardlösung des Pierce BCA Protein Assay Kit.

Die Lösungen wurden vor der Entnahme für die nächst kleineren Verdünnungsstufen mehrmals durch Pipettieren gemischt, um eine Konzentrationsangleichung im gesamten Gefäß zu erreichen.

Es wurden jeweils 25 µl der Standardlösungen und der Proben in Duplikaten auf eine 96-Loch-Platte (*Pierce 96-Well Plate*, Thermo Scientific, USA) gegeben. Wenn aufgrund der Trübung des Proteinüberstands eine hohe Proteinkonzentration zu erwarten war, wurden die Proben zusätzlich im Verhältnis 1:5 mit PBS/NaCl verdünnt und ebenso in Duplikaten in die 96-Loch-Platte gegeben. Danach wurde auf jedes mit Standardlösung oder Probe gefüllte Feld der Platte 200 µl des WR pipettiert, die Platte von oben zugeklebt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Folie entfernt und umgehend die Absorption bei 540 nm im Spektrophotometer (Multiscan Ascent VI. 2, MTX Lab Systems, USA) gemessen. Nach Durchführung des Pierce BCA Protein Assay konnte berechnet werden, wie viele µl von Probe und Verdünnungsmedium jeweils in *Protein LoBind Tubes* miteinander gemischt werden mussten, um in 300 µl eine Konzentration von 0,1 mg/ml Gesamtprotein zu erhalten. Bevor die Proteinüberstände der PatientInnenproben verdünnt wurden, wurde 5 Minuten bei 7300 rpm und 4 °C zentrifugiert.

2.3.3 ELISAs zur Detektion von IL-26 und TXN

Im letzten Schritt konnte mithilfe des *Human IL-26 ELISA Kits* (Cusabio, Wuhan, China) und des *TXN ELISA Kits* (TXN ELISA Kit, Cloud-Clone Corporation, China) die Menge an IL-26 und TXN bestimmt werden. Das Schema in Abb. 5 verdeutlicht den Ablauf am Beispiel des IL-26-ELISAs: In den zugegebenen Proben enthaltenes, freies IL-26 bindet an die spezifischen Antikörper. Nach der Inkubationszeit werden die ungebundenen Bestandteile abgewaschen. Um die Menge an IL-26 zu detektieren, wird ein Biotin-gekoppelter Antikörper gegen IL-26 dazugegeben. Das gekoppelte Biotin wird nach Inkubieren und Abwaschen von dazugegebenem Avidin erkannt und gebunden. Avidin ist wiederum an Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Diese kann eine zugegebene Substratlösung umsetzen und so zu einer Farbentwicklung führen. Nach Zugabe eines die Reaktion stoppenden Reagenzes wird die Farbintensität der Proben gemessen und miteinander verglichen. Die minimal detektierbare Konzentration an IL-26 lag bei diesem ELISA bei 15,6 pg/ml.

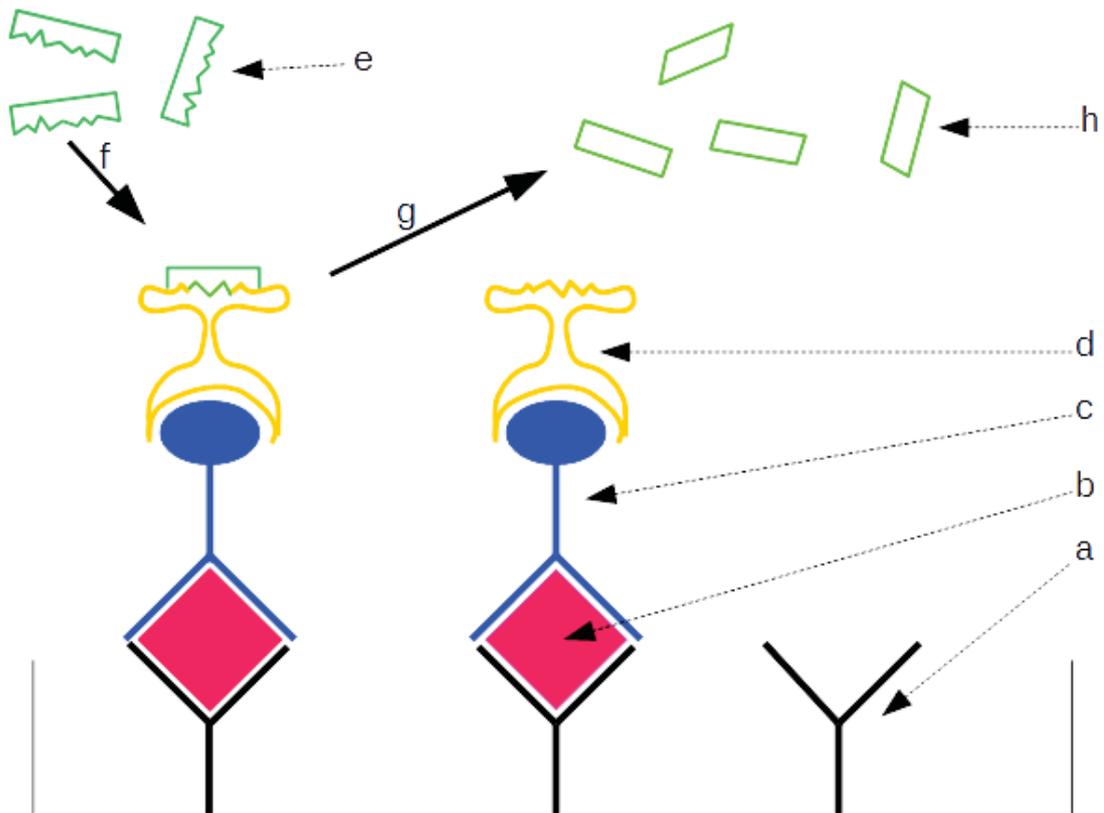


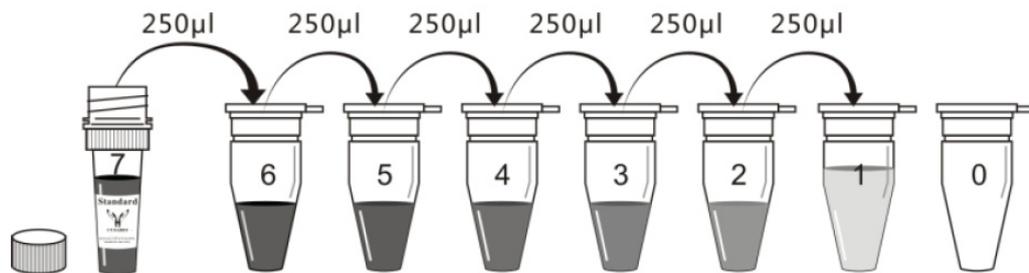
Abb. 5: Schema des IL-26-ELISA. Je mehr IL-26 vorhanden ist, desto mehr Produkt wird gebildet und desto stärker ist der Farbumschlag.

a) mit Antikörpern gegen IL-26 beschichtete Platte; b) IL-26; c) Biotinverknüpfter anti-IL-26-Antikörper; d) Avidin, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) verknüpft; e) Substratlösung; f) das Substrat bindet an das aktive Zentrum der HRP; g) die Bindung in f führt zu einer Konformationsänderung und somit zum Farbumschlag des Substrates, h) aus dem Substrat entstehendes Produkt mit einer anderen Farbe.

© Laura Gayk

Der IL-26-ELISA wurde analog zum Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bevor mit der Vorbereitung der benötigten Reagenzien begonnen werden konnte, wurden diese 30 min lang auf Raumtemperatur erwärmt. Abhängig von der Probenanzahl wurden dann die benötigten Mengen an verdünnten Biotin-Antikörpern, HRP-Avidin und Waschpuffer hergestellt. Sowohl der Biotin-gekoppelte Antikörper als auch HRP-Avidin wurde 100-fach verdünnt. Der Waschpuffer wurde 25-fach mit destilliertem Wasser verdünnt. Danach wurden die Standardlösungen hergestellt (s. Abb. 6), um später von den Ergebnissen der Absorption auf eine Konzentration umrechnen zu können. Der lyophilisierte IL-26-Standard wurde mit 1 ml *sample diluent* auf eine Konzentration von 4000

pg/ml eingestellt (Gefäß S7). In sechs weitere 1,5 ml fassende Reaktionsröhrchen wurde je 250 µl *sample diluent* gegeben und dann 250 µl aus dem höchstkonzentrierten Gefäß, S7, entnommen und in das Gefäß S6 pipettiert. Hier wurde auf- und abpipettiert und dann wurden 250 µl weiter in das Gefäß S5 überführt. Dies wurde bis S1 fortgeführt. Das Gefäß S0 diente als Negativkontrolle und enthielt nur *sample diluent* und keinen IL-26 Standard.



Tube	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	0

Abb. 6: Verdünnungsschema des Standardreagenz des IL-26-ELISA. Aus dem Standard, S7, wird die in der Tabelle angegebene Menge entnommen und in S6 pipettiert. Dies wird bis zu Erreichen des S1 fortgeführt. S0 ist eine Negativkontrolle und enthält keine Standardlösung. (Quelle der Abb.: Handbuch des IL-26 ELISA Kit, CusaBio)

Es wurden je 100 µl Probe oder Standardlösung eingesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Flüssigkeit durch Aspirieren entfernt, jeweils 100 µl Biotin-Antikörper dazugegeben und nochmals 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde aspiriert und die Platte auf Zellstoff geklopft. Es folgte dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer pro Probe und einer Einwirkzeit von 2 min. Nach Zugabe von 100 µl HRP-Avidin folgte eine erneute Inkubation über 1 h bei 37 °C. Um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wurde danach fünfmal gewaschen. Nach Zugabe von 90 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB-Substrat) und 15-30 min Inkubation bei 37 °C wurde 50 µl *stop solution* (hier Schwefelsäure, H₂SO₄) hinzugegeben. Innerhalb der folgenden 5 min wurde die Absorption bei 450 nm, mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm, mithilfe des Multiskan Ascent VI.2 (MTX Lab Systems, USA) gemessen.

Der TXN-ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers des ELISA-Kits für Thioredoxin (Cloud-Clone Corporation, Wuhan, China) durchgeführt. Zur Vorbereitung gehörte die Herstellung einer Standardlösung. Acht je 1,5 ml fassende Gefäße (Eppendorf, Deutschland) wurden bereitgestellt und in Gefäß 2-8 je 125 µl Standardverdünnungslösung pipettiert. In die Gefäße 1 und 2 wurden 125 µl des Standards pipettiert. Dann wurde in die Gefäße 3-7 jeweils 125 µl aus dem je eine Nummer kleineren Gefäß pipettiert, gemischt und jeweils wieder 125 µl entnommen. Es entstand eine Verdünnungsreihe der Standardlösung. Detektionslösung A und B wurden zentrifugiert, dann je 20 µl Detektionslösung mit je 1980 µl Ansatzverdünnungslösung A oder B gemischt. Dann wurde auf einer 96-Loch-Platte in jedes ausgesuchte Loch 100 µl Standard- oder Probelösung pipettiert und 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeiten wurde jeweils 100 µl Detektionslösung A hinzugegeben und 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 350 µl Waschlösung, die zuvor aus 1 ml Waschlösungskonzentrat pro 29 ml destilliertem Wasser hergestellt wurde. Dann wurde in jedes Loch 100 µl Detektionslösung B gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen, wurde je 90 µl TMB-Substrat dazugegeben und 28 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von 50 µl Stop-Lösung und das Messen der Absorption bei 450 nm mithilfe des Multiskan Ascent VI.2 (MTX Lab Systems, USA) schlossen diesen Versuch ab.

Die Rohdaten des IL-26- sowie des TXN-ELISA wurden mittels GraphPad Prism ausgewertet.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie

2.4.1 Gewebeschnitte

Die bei – 80 °C aufbewahrten Präparate wurden zuerst in ein *KP-Cryo Compound* Einbettungsmedium (Klinipath Cryo Compound, Klinipath BV, Niederlande) eingebettet. Gearbeitet wurde bei – 30 °C, da bei dieser Temperatur das *KP-Cryo-Compound* Einbettungsmedium durch die Kälte aus einer bei Raumtemperatur farblosen, dickflüssigen Lösung, zu weißem, festem Material reagiert. Pro Präparat wurden 20 Schnitte angefertigt und auf zehn Objektträger

je zwei Schnitte aufgetragen. Die korrekte Lage der Präparate wurde mittels Lichtmikroskopie kontrolliert. Die Objektträger trockneten an der Luft und wurden danach tiefgefroren ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-IL-26 Antikörpern

Um die Gewebeschnitte zu färben, wurden die Präparate aufgetaut und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Präparate 10 min lang bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Aceton fixiert. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift voneinander abgegrenzt. Es folgte ein dreimaliges, je 3 min dauerndes Waschen mit PBS. Die Objektträger wurden in eine Feuchtkammer gelegt, jeweils mit $200\text{ }\mu\text{l}$ Blockierungspuffer, der aus PBS mit 2 % Eselserum (*Donkey Serum*, Sigma Life Science, USA), 0,1 % Fischgelatine (*Gelatin from cold water fish skin*, Sigma Life Science, USA) und 0,05 % Tween20 (Tween®20, Polysorbat 20, Carl Roth GmbH, Deutschland) bestand, bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach Entfernen des Blockierungspuffers wurde jede Probe mit einem primären anti-IL-26-Antikörper (Klon 142-69) bedeckt [40]. Dieser wurde, abhängig von der Ausgangskonzentration, in Blockierungspuffer auf $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Als Kontrolle diente der Immunglobulinsubtyp G_1 (IgG_1) der Maus (*IgG₁ Isotype Control, purified Mouse monoclonal IgG*, R&D Systems, USA), ebenfalls verwendet mit $5\text{ }\mu\text{g/ml}$. Nach Inkubation über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 555 *donkey-anti-mouse*, H+L, Invitrogen, USA) dazugegeben. Seine Verdünnung betrug 1:1000 in Blockierungspuffer und für jede Probe wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ verwendet. Nach 45 min Inkubation bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer wurden die Objektträger wieder dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellkerne zu färben, wurde als nächstes auf jede Probe $100\text{ }\mu\text{l}$ 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Invitrogen, USA), 1:1000 in PBS, pipettiert. Die Inkubation dauerte 10 min bei Raumtemperatur. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit PBS erhielt jedes gefärbte Präparat einen Tropfen Fluoromount (Fluoromount-G™, eBioscience, USA) und ein quadratisches Deckglas (Engelbrecht, Deutschland) mit einer Kantenlänge von 18 mm. Vor dem Mikroskopieren wurden die Proben noch über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.4.3 Immunhistochemie mit anti-TXN-Antikörper

Um Proteine in Gewebeschnitten nachzuweisen, ist die Immunhistochemie eine Alternative zur Immunfluoreszenz [110]. Ein Antikörper wird hierbei an ein Enzym gekoppelt, das ein farbloses Substrat *in situ* in ein farbiges Produkt umwandelt, dessen Ablagerungen im Mikroskop direkt beobachtbar sind [94].

Das Ziel dieser Färbung war es, mithilfe eines Antikörpers die Lokalisation des TXN in der Haut zu beschreiben. Um dies zu erreichen, sollte an das im Präparat vorhandene TXN zuerst ein aus der Ziege isolierter anti-TXN-Antikörper binden und an diesen ein weiterer Antikörper, der sich gegen die Immunglobuline der Ziege richtet. Dieser wiederum ist mit Biotin verknüpft. Das Biotin wird dann im nächsten Schritt von Streptavidin gebunden. Das Substrat für dieses Enzym ist 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC). Unter Anwesenheit von H_2O_2 wird das AEC durch die HRP oxidiert und zeigt einen roten Farbumschlag. Dieser Farbumschlag tritt an den Stellen auf, an denen TXN im Präparat vorhanden ist. Für diese Färbung wurden Objektträger verwendet, die je zwei aus Hautstanzen geschnittene und in *KP Cryo-Compound* eingebettete Hautproben enthielten. Je eine Probe davon wurde mit einem anti-TXN-Antikörper (*Human Thioredoxin-1 Antibody*, Polyclonal Goat IgG, Biotechne, USA) inkubiert, die andere mit dem Immunglobulin G (*IgG Isotype Control, purified Goat monoclonal IgG*, Biotechne, USA). Zuerst wurden die bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Objektträger an der Luft getrocknet, beschriftet und die Präparate mithilfe eines Fettstiftes voneinander abgegrenzt. Zum Fixieren wurden sie 15 min in mit PBS verdünnten 4 % Paraformaldehyd (PFA, Merck, KGgA, Deutschland) inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal je 5 min in PBS gewaschen. Es folgte 1 h Inkubation mit einem Blockierungspuffer, bestehend aus PBS mit 10 % Pferdeserum (Biochrom GmbH, Deutschland) und 0,05 % Triton X (Triton X 100, Carl Roth GmbH & Co, Deutschland). Inkubiert wurde immer in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Nachdem der Blockierungspuffer entfernt wurde, wurden die Präparate 2 h entweder mit 1:500 verdünntem anti-TXN-Antikörper (Anti-human Thioredoxin-1, Stock: 1,49 mg/ml, Biotechne, USA), also mit einer Endkonzentration von 2,98 $\mu\text{g/ml}$, oder mit 1:333 verdünntem IgG_1 der Ziege (*IgG₁ Isotype Control, purified Goat monoclonal IgG*, Stock: 1 mg/ml, R&D

Systems, USA), mit einer Endkonzentration von 3 µg/ml inkubiert. Beide Antikörper wurden durch PBS verdünnt, welches zusätzlich 2 % Pferdeserum und 0,05 % Triton X enthielt. An den folgenden Waschvorgang schloss sich eine Inkubation aller Präparate mit 0,6 % Wasserstoffperoxid (30 % H₂O₂, Rotipuran® p.a., Carl Roth GmbH & Co, Deutschland) in PBS an. Dann wurde erneut gewaschen. Um die gebundenen Antikörper zu detektieren, wurde erst ein Vectastain®ABC-Kit (Vectastain®ABC-Kit Peroxidase GOAT IgG, Vector Laboratories, Inc, USA) genutzt. In 6,3 ml PBS wurden 700 µl Triton X und ein Tropfen eines biotinylierten Antikörpers gegen das Immunglobulin G der Ziege pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 45 min. Nach dem Waschen wurde 10 µl Streptavidin/HRP (Dako Deutschland GmbH, Deutschland) in 5 ml PBS für 45 min auf die Präparate gegeben. Es wurde zweimal je 2 min in PBS und ein drittes Mal in destilliertem Wasser gewaschen. Für die folgende, letzte Inkubation wurde ein AEC-2-Komponenten-Kit (DCS ChromoLine, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Deutschland) genutzt. Zu 2 ml AEC-Konzentrat mit H₂O₂ als Puffer, wurden 40 µl AEC-Substrat hinzugefügt. Unter einem Lichtmikroskop wurde geschaut, wann die gefärbten Bereiche gut zu erkennen waren, sodass die Inkubation beendet werden konnte. Als Gegenfärbung diente ein 2 min Aufenthalt der Präparate in Hämatoxylin (Accustain® Hematoxylin Solution, Sigma Aldrich, Deutschland), gefolgt von zweimal 5 min in Leitungswasser und 2 min in Lithiumcarbonat (Carl Roth GmbH & Co, Deutschland). Nachdem das Lithium durch dreimaliges 5 min Waschen in Leitungswasser entfernt wurde, war die Färbung beendet und die Präparate wurden mit DCS Eindeckmedium (DCS LabLine, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Deutschland), eingedeckt.

2.4.4 Mikroskopische Auswertung

Zum Mikroskopieren der Immunfluoreszenzfärbungen wurde ein Durchlicht-Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Deutschland) sowie eine monochromatische Kamera (AxioCam, MRM, Zeiss, Deutschland) genutzt. Das verwendete Computerprogramm war Axiovision Rel.4.8 (Zeiss, Deutschland). Die Belichtungszeit wurde zu Beginn festgelegt und für alle Proben einer Färbung für den jeweiligen Farbkanal beibehalten. Dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit der Intensität der Farben unterschiedlicher Präparate. Alle Fotos einer

Immunfluoreszenzfärbung von Präparaten der Rosazea sowie gesunder Haut wurden identisch bearbeitet. Bei allen Bildern wurde zuerst das Hintergrundrauschen mittels *Rolling Ball Background Subtraction* subtrahiert. Bei dem blauen Kanal mit DAPI wurde die Sättigung bei allen Bildern auf 1 % angehoben.

Um die Fotos derselben Färbung von Rosazea und gesunder Haut objektiv miteinander vergleichen zu können, wurde ein *Macro* aufgenommen, mit dessen Hilfe alle Bilder gleich bearbeitet wurden. Zuerst wurde jedes Foto in ein schwarz-weißes *Binary*-Bild umgewandelt. Dafür wurden die Methode *Moments* und ein weißer Hintergrund gewählt. Mithilfe von *Create Selection* nahm das Programm eine Auswahl aller gefärbten Pixel vor. Dann erfolgte die Messung mit der Funktion *Measure*. Von der Messung wurden bei allen Bildern zum Hintergrundrauschen gehörende sehr kleine gefärbte Flächen ausgeschlossen. Die Ergebnisse mussten nach dem Messen noch in Prozent der Gesamtpixel pro Foto umgerechnet werden. Dies wurde mittels Microsoft Excel (Microsoft Excel 2006, Redmond, USA) umgesetzt. Für die Mikroskopie der Immunhistochemie wurde das Axioskop 40 (Zeiss, Deutschland) verwendet.

2.5 Modifizierte DNA-Quantifizierung

Das Ziel dieser Methode war es, herauszufinden, ob IL-26 unter reduzierenden Bedingungen stärker an DNA bindet als unter normalen Bedingungen. Der Versuch wurde mithilfe des *Quant-iT™ Pico Green® dsDNA-Assay Kit* (Invitrogen, USA) durchgeführt.

Unter sterilen Arbeitsbedingungen bei Raumtemperatur wurden zuerst 1,5 ml große *Protein LoBind Tubes* (Eppendorf, Deutschland) beschriftet. In jedes Gefäß wurde IL-26 von 2 µM seriell absteigend hinzugegeben und zu der Hälfte der Proben zusätzlich reduzierendes Dithiothreitol (DTT, final: 2 mM) pipettiert. Die Proben wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 52 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle galt ein nur mit nukleasefreiem Wasser gefülltes Gefäß. Nach 30 min Inkubation wurde überall, außer bei der Negativkontrolle, 5 µl DNA (final: 3 µg/ml) dazugegeben. Wieder wurde 30 min inkubiert und dann je 3 µl PicoGreen Farbstoff in Pufferlösung hinzugegeben, sodass jedes Gefäß nun 60 µl enthielt. Die Pufferlösung wurde aus 4 µl Pico Green, 50 µl TE-Puffer und 946

μ l nukleasefreiem Wasser hergestellt. Da der Farbstoff fluoresziert, wurde als Lichtschutz Aluminiumfolie verwendet. Nach 2 min Inkubation wurden die Inhalte aller Gefäße in eine 96-Loch-Platte überführt, die im Vergleich zur Standardplatte nur die halbe Fläche pro Loch aufwies. Durch diese halbe Fläche verkleinert sich das minimal einsetzbare Volumen deutlich ohne Messverluste in Kauf nehmen zu müssen. Die Fluoreszenz wurde dann mittels Spektrophotometer (Fluoroskan Ascent und TECAN infinite M200, Tecan, Schweiz) mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Detektionswellenlänge von 538 nm detektiert.

In diesem Versuch bindet das IL-26 an die DNA und es entstehen IL-26/DNA-Komplexe. Je mehr Komplexe entstehen, desto weniger *Pico Green* Farbstoff kann sich an die DNA anlagern und die detektierbare Fluoreszenz bei 538 nm nimmt ab. Um reduzierende Bedingungen zu schaffen, wurde DTT (2 mM) hinzupipettiert.

2.6 Statistik und Auswertungen

Alle Messungen wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardfehler (*Standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Signifikanzwerte (P-Werte), die größer als 0,05 waren, wurden als nichtsignifikant betrachtet. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden in den Abbildungen mit einem * hervorgehoben, P-Werte, die kleiner als 0,01 waren mit ** und P-Werte, die hoch signifikant und kleiner als 0,001 waren, mit ***.

Die Graphen wurden mittels *GraphPad Prism* (*GraphPad Software, Inc.*, USA) erstellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Probe.

Um die synthetisierte Menge von IL-26 mit anderen Proteinen zu korrelieren, wurden Trendlinien genutzt und sowohl die P-Werte als auch Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans Rho (ρ)) angegeben.

Die Färbungsfotos der Immunfluoreszenzfärbung und der Immunhistochemie wurden mithilfe des Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramms ImageJ 1.49v (*National Institutes of Health*, USA, [111]) bearbeitet.

Um die Immunfluoreszenzfärbungen in Versuch 3.1.3. zu quantifizieren, wurde zuerst der Hintergrund der Fotos mithilfe eines *Rolling Ball* mit dem Durchmesser des größten vorhandenen Moleküls subtrahiert. Der Kontrast wurde bei allen

Bildern normalisiert und auf 0,01 % gesättigte Pixel festgelegt. Zur Berechnung der jeweils angefärbten Fläche wurden die Fotos in 8 bit umgewandelt. Ein Filter sowie eine Schwelle (*Threshold*) wurden ausgewählt und die Bilder zu binären Bildern codiert. Darauf folgte ein maschinelles Zählen der Partikel und Summieren der gefärbten Quadratpixel. Partikel unterhalb einer Größe von 25 Quadratpixel sowie oberhalb einer Größe von 2500 Quadratpixel wurden konsequent ausgeschlossen, da es sich dabei um Artefakte handelte.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des IL-26 in der Rosazea

3.1.1 Expression von *IL26* mRNA in der Rosazea

Um zu untersuchen, ob sich die Genexpression des *IL26* in der Rosazea von der Expression in gesunder Haut unterscheidet, wurden zuerst qPCRs durchgeführt. Die mRNA wurde aus Hautstanzen, entnommen von PatientInnen mit Rosazea (n = 17) sowie von ProbandInnen ohne Rosazea (n = 10), gewonnen. Elf der 17 Rosazeaprobe stammen, wie in Abschnitt 2.1. erwähnt, aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums CHUV in Lausanne in der Schweiz. Die übrigen 6 Rosazeaprobe sowie die gesunde Haut stammen aus der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Daten wurden in relativer Expression, verglichen mit *GAPDH*, erhoben. Der Mittelwert der *IL26*-Expression in Rosazea liegt bei 25 relativen Einheiten (*Relative Units*, RU), der Mittelwert der *IL26*-Expression in gesunder Haut bei unter 5 RU. Hier gibt es bei einigen Proben von PatientInnen mit Rosazea Werte, die im Bereich der Werte gesunder Haut liegen, da die Hautproben auch aus den Anfangsstadien der Rosazea und aus Randbereichen der Erkrankung am Übergang zu gesunder Haut stammen. Die Expression des *IL26* in Rosazea ist auf Genebene mit einem P-Wert von 0,0051 zu einem Signifikanzniveau von 1 % erhöht (Abb. 7).

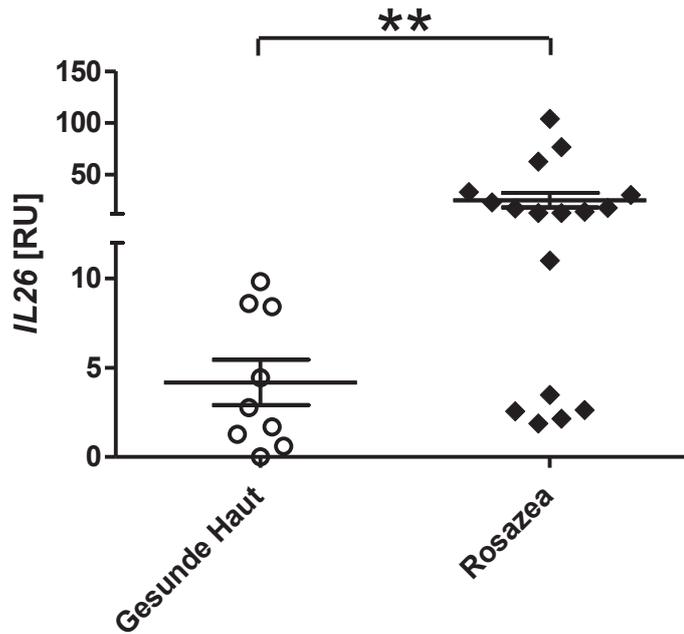


Abb. 7: IL26-Genexpressionsanalyse in Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut. Die Expression von *IL26* wurde mittels qPCR in Hautstanzen von PatientInnen mit Rosazea (n = 17) und von Hautstanzen gesunder Kontrollen (n = 10) analysiert. Die Daten wurden in relativer Expression, verglichen mit *GAPDH*, erhoben. Die Messungen wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardfehler (*Standard error of the mean*, SEM) (**, $P < 0,01$) dargestellt.

3.1.2 Proteinbiosynthese von IL-26 in der Rosazea

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob sich auch die Proteinbiosynthese des IL-26 in Rosazea und gesunder Haut unterscheidet. Hierzu wurde ein kommerzieller IL-26 ELISA genutzt. Die Proteinmenge wurde in pg/ml pro 100 μ g/ml Gesamtprotein gemessen. In der Rosazea (n = 11) konnte im Mittel 420 pg/ml IL-26 pro 100 μ g/ml Protein detektiert werden, während in gesunder Haut (n= 15) mit nur 200 pg/ml vergleichsweise wenig IL-26 gemessen wurde. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse: IL-26 ist auch auf Proteinebene mit einem P-Wert von 0,0013, entsprechend einem Signifikanzniveau von 1 %, im Vergleich zu gesunder Haut hochreguliert (Abb. 8). Die Proteinsynthesen können jedoch nicht direkt mit der Genexpressionen verglichen werden, da die Proben von unterschiedlichen Donoren stammen.

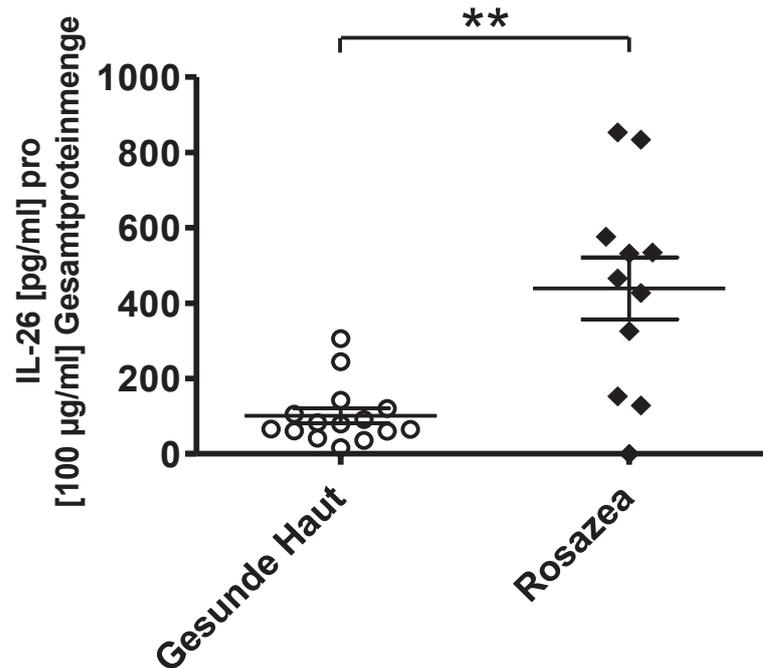


Abb. 8: Analyse der Proteinbiosynthese von IL-26 in Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut. Die Proteinmenge von IL-26 wurde mittels ELISA in Hautstanzen von PatientInnen mit Rosazea (n = 11) und Hautstanzen von gesunden Kontrollpersonen (n = 15) analysiert und als Menge an IL-26 pro 100 µg/ml Gesamtproteinmenge der Probe dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Grafik stellt den Mittelwert ± SEM dar. (**, P < 0,01)

Um die anatomische Lokalisation der Synthese des IL-26 zu charakterisieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt (Abb. 9). In den Negativkontrollen mit Immunglobulin G₁ konnten keine Effloreszenzen nachgewiesen werden. Das IL-26 konnte sowohl in gesunder Haut, als auch in der Rosazea detektiert werden. In der erkrankten Haut wurde dabei eine deutlich erhöhte Fluoreszenz wahrgenommen. Der stärkste Nachweis gelang in der Dermis, doch auch in der Epidermis und in der Subkutis konnte das IL-26 nachgewiesen werden. Die das IL-26 mutmaßlich produzierenden T_H17- oder T_H1-Zellen emigrieren aus dem Blut der Gefäße der Dermis und befinden sich im sichtbaren, entzündlichen Infiltrat der Dermis und Subkutis.

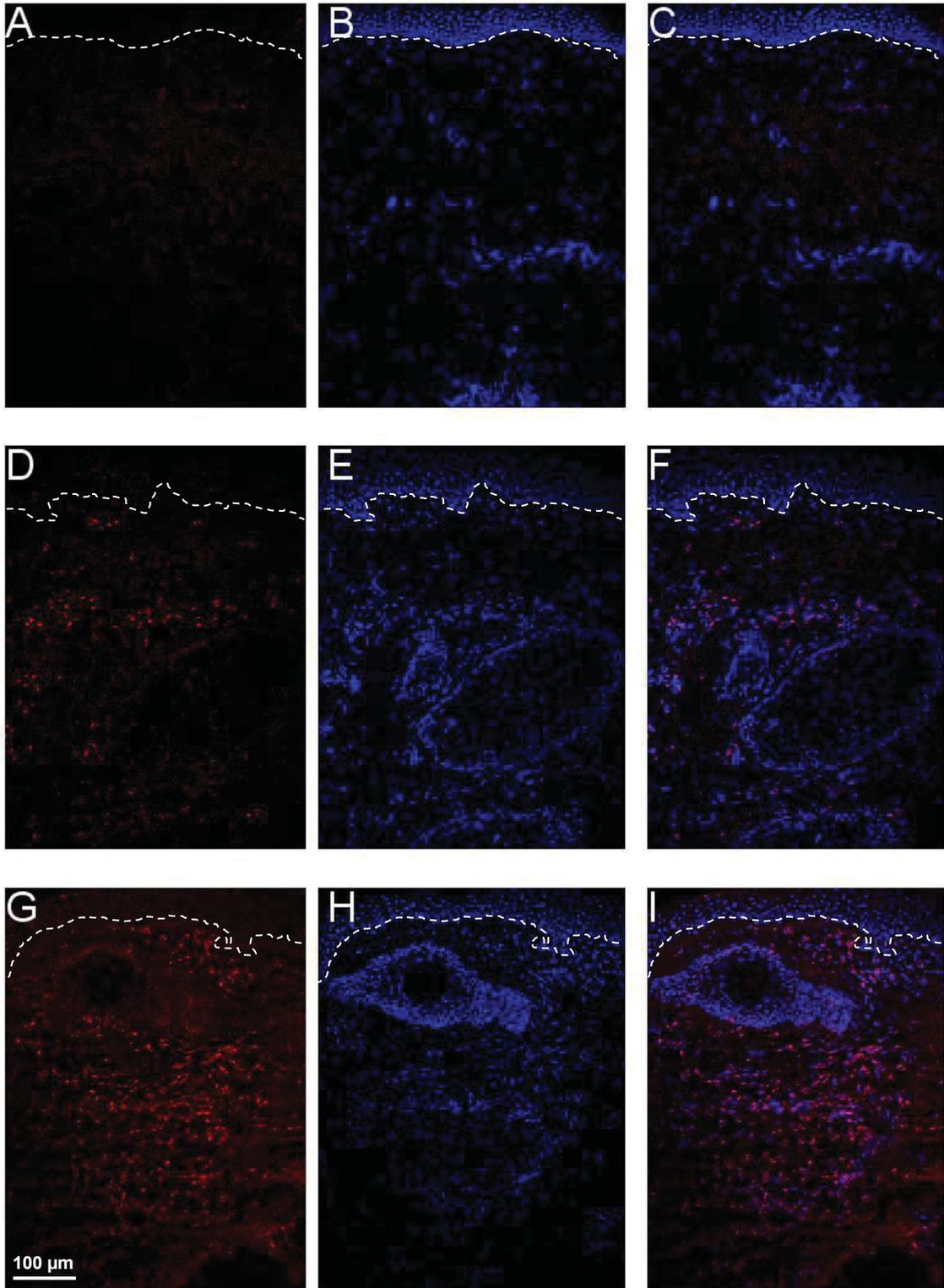


Abb. 9: IL-26 ist in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut überexprimiert und liegt in der Rosazea in allen Hautschichten vor. A-I, Repräsentative Färbungen von kryokonservierten Hautstanzen mittels Immunfluoreszenz, gefärbt mit DAPI (blau, 1:1000) und anti-IL-26-Antikörper (Klon 142-69, 5µg/ml), die weiße gestrichelte Linie stellt die per Hand

eingezeichnete Basalmembran dar. **A-C**, gesunde Haut, **D-I**, Rosazea (dabei ist D-F eine Hautprobe und G-I eine andere), **A,D,G**, nur anti-IL-26-Antikörper, **B,E,H**, nur DAPI, **C,F,I**, anti-IL-26-Antikörper und DAPI (Vergrößerung: 1:200).

3.1.3 Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen objektiv zu beurteilen, wurden die Anteile der gefärbten Areale an der Gesamtfläche der Fotos ermittelt. Die miteinander verglichenen Bilder stammten alle aus der gleichen Färbung am selben Tag und sind im Anhang exemplarisch dargestellt (s. Abb. A3-A10). Je nach Größe des Hautschnittes, wurden von jedem Präparat zwei bis zehn Bilder ausgewertet und deren Mittelwerte miteinander verglichen. Die drei Präparate der Rosazea gehörten zum Subtyp III (Rhinophym). Der Mittelwert der gefärbten Pixel in der Rosazea liegt bei 3 %, der Mittelwert in der gesunden Haut bei 1,8 % (Abb. 10). Zu einem Signifikanzniveau von unter 5 % ist in den Fotos der Färbungen von Rosazea mehr Vorkommen von IL-26 festzustellen als in gesunder Haut.

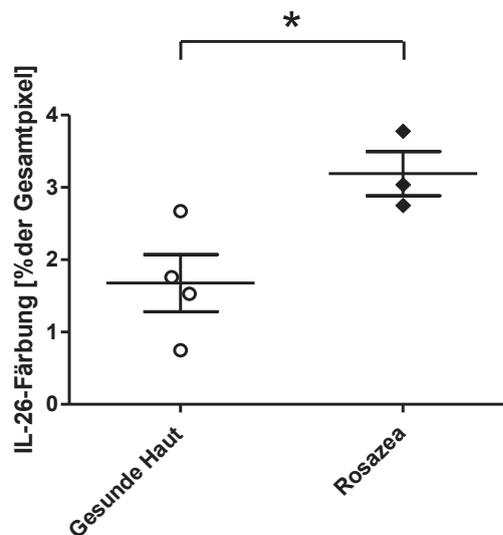


Abb. 10: Quantifizierung der IL-26-Immunfluoreszenzfärbungen.

Die Hautschnitte (gesunde Haut; n=4 und Rosazea; n=3) wurden mit einem anti-IL-26-Antikörper (Klon 142-69-1) gefärbt. Die Anteile der gefärbten Areale an der Gesamtfläche der Fotos wurden mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ 1.49v ermittelt. Ein Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus 2-10 analysierten Bildern eines Präparates mit Epidermis und Dermis. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Darstellung als Mittelwert \pm SEM (*, $P < 0,05$).

3.2 Bindung von IL-26 an DNA unter reduzierenden Bedingungen

Mithilfe des folgenden Experiments wurde untersucht, ob das IL-26 unter reduzierenden Bedingungen im Vergleich zu einem nicht reduzierenden Milieu eine veränderte Bindungsaktivität zu DNA aufweist. Das kationische IL-26 kann an anionische DNA binden und Komplexe formen [40]. Der Farbstoff *Pico Green* bindet an DNA und wird daher normalerweise zur Quantifizierung von DNA verwendet. Im folgenden Experiment konkurriert *Pico Green* mit IL-26. Da IL-26 vor *Pico Green* zur DNA pipettiert wurde, bedeutet eine niedrige Fluoreszenz, dass eine IL-26/DNA-Komplexbildung stattgefunden hat. Unter nichtreduzierenden Bedingungen kann das IL-26 den Farbstoff bei einer Menge von 2 μM so stark von den Bindungsstellen an der DNA verdrängen, dass eine verringerte Fluoreszenz nachweisbar ist (Abb. 11).

Unter Anwesenheit des chemischen Reduktionsmittels DTT genügt eine Menge von 0,8 μM IL-26, um eine Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Unter reduzierenden Bedingungen wird demnach in diesem experimentellen Rahmen eine um 60 % geringere Menge an IL-26 für die gleiche Bindungsaktivität benötigt. Die Anwesenheit von DTT, auch in höheren Konzentrationen, beeinflusst die Bindung des *Pico Green* an DNA nicht (s. Appendix Abb. A1).

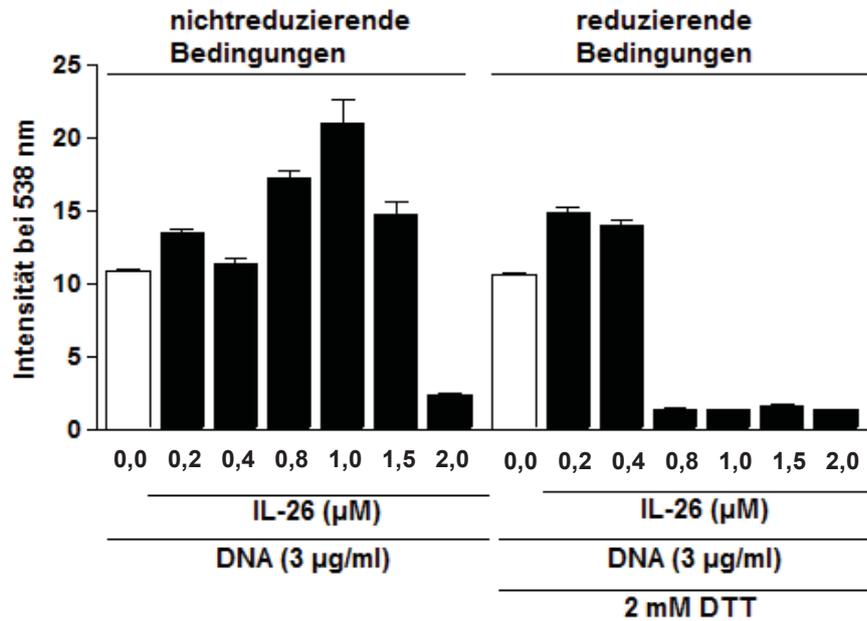


Abb. 11: Das Aufspalten von Disulfidbrücken verbessert die Bindung zwischen IL-26 und DNA. Auswertung der Komplexbildung von IL-26 und DNA unter verschiedenen Bedingungen nach Zugabe von Pico Green und fluorometrischer Messung (538 nm). Titration von IL-26/DNA Komplexen unter Standard- und reduzierenden Bedingungen (2mM DTT).

3.3 Untersuchung des Thioredoxinsystems in der Rosazea

Da im vorherigen Abschnitt demonstriert werden konnte, dass IL-26 unter reduzierenden Bedingungen besser an DNA binden kann, haben wir folgend das physiologische Redoxsystem, bestehend aus TXN und TXNRD1, in der Rosazea untersucht.

3.3.1 Expression von Thioredoxin-mRNA in der Rosazea

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob das *TXN* in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut verändert exprimiert wird. Die Genexpression des *TXN* wurde mittels qPCR quantifiziert. Es wurde mRNA aus Hautstanzen von an Rosazea erkrankten PatientInnen (n = 17) und von gesunder Haut (n = 10) verwendet. Die Erhebung der Daten erfolgte in relativer Expression, verglichen mit *GAPDH*. In der Rosazea liegt der Mittelwert, gemessen in RU, bei 5×10^5 . In gesunder Haut sind hingegen im Mittel $0,2 \times 10^5$ RU. Wie in der Abb. 12 dargestellt, wurde in der Rosazea hochsignifikant mehr *TXN* detektiert als in gesunder Haut. Der P-

Wert war $<0,001$ und das Signifikanzniveau betrug 0,1 %. Analog zu den Experimenten mit IL-26, konnten bei den Ergebnissen der Versuche mit *TXN* bei Betrachtung der Rohdaten keine Zusammenhänge zwischen Herkunft der Proben oder Subtypen und Gehalt an *TXN* gefunden werden.

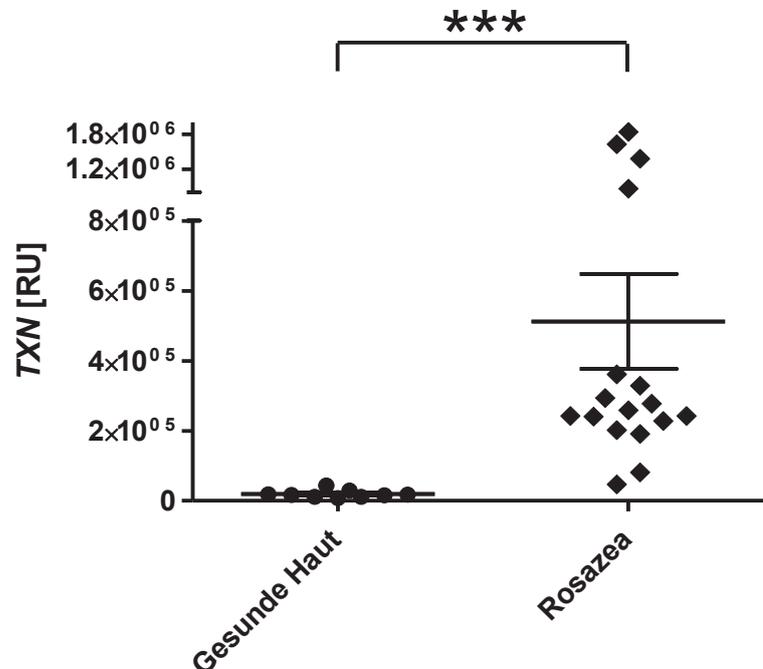


Abb. 12: Genexpressionsanalyse von *TXN* in Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut.

Die Expression von *TXN* wurde mittels qPCR in Hautstanzen von PatientInnen mit Rosazea (n = 17) und gesunder Haut (n = 10) verglichen. Die Expression von *TXN* wurde durch den Vergleich mit der Expression von *GAPDH* relativiert. Statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test, dargestellt als Mittelwert \pm SEM (***, P $<0,001$).

3.3.2 Proteinbiosynthese von *TXN* in der Rosazea

Da die Genexpression des *TXN* in der Rosazea größer ist als in gesunder Haut, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob auch in der Proteinbiosynthese Unterschiede vorliegen. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde ein ELISA zum Nachweis von *TXN* durchgeführt. Die Proteinmenge an *TXN* pro 100 $\mu\text{g/ml}$ Gesamtproteinmenge der Hautstanze wurde für Rosazea (n = 11) und gesunde Haut (n = 10) miteinander verglichen. In der Rosazea wurden pro 100 μg durchschnittlich über 300 pg *TXN* detektiert (s. Abb. 13), in gesunder Haut lag der Mittelwert unter 200 pg. Es wurden demnach auch in der Proteinbiosynthese

Unterschiede festgestellt: Die Synthese des TXN war in der Rosazea mit einem P-Wert von 0,0392 zu einem Signifikanzniveau von 5 % höher als in gesunder Haut.

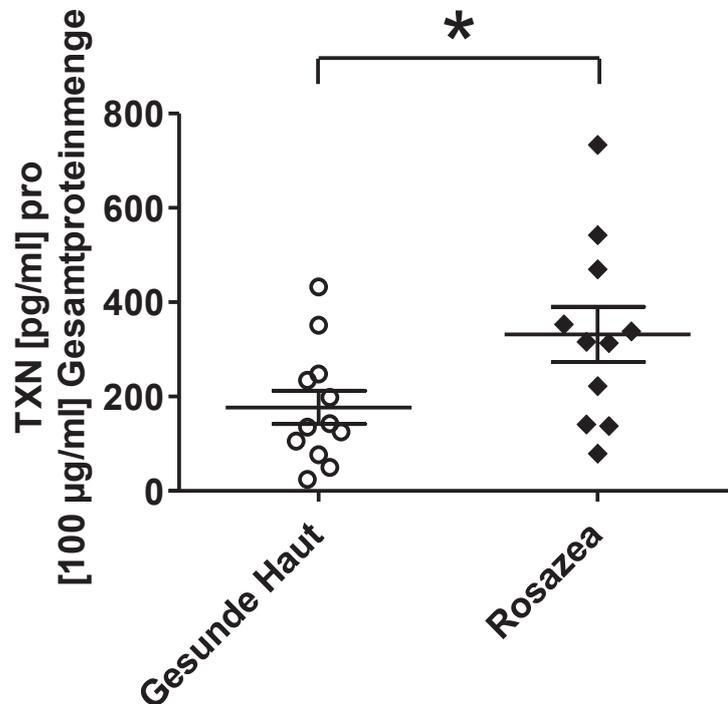


Abb. 13: Analyse der Proteinbiosynthese von TXN in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut. Mittels ELISA wurde die Menge von TXN in Hautstanzen von PatientInnen mit Rosazea (n = 10) und gesunden Kontrollen (n = 12) quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Darstellung als Mittelwert \pm SEM (*, $P < 0,05$).

3.3.3 Korrelation zwischen der *IL26*- und der *TXN*-Genexpression

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Genexpression von *IL26* und der Genexpression von *TXN* gibt, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (Abb. 14). Es wurde die in den einzelnen Proben detektierte Menge an *IL26* mit der Menge an *TXN* verglichen. In gesunder Haut (n = 12) ist in der Geraden, die die Trendlinie illustriert, eine leichte positive Steigung zu sehen. In der Rosazea (n = 11) zeigt die Trendlinie eine deutliche Steigung. Die Datenverteilung ist nicht willkürlich, sondern es gilt mit einem Signifikanzniveau von 0,77 % der Zusammenhang: Je mehr *IL26* eine der Rosazeaprobe enthält,

desto mehr *TXN* ist in ihr vorhanden und *vice versa*. Der P-Wert für die Korrelationsanalyse für gesunde Haut beträgt 0,0838 und der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans Rho) beträgt 0,0788. In der Rosazea beträgt der P-Wert 0,0077, der Spearmans Rho 0,6217. Hier ist die Korrelation zwischen *TXN* und *IL26* auf einem Signifikanzniveau von 1 % signifikant. Ist Spearmans Rho größer als 0, so ist ein positiver Zusammenhang wahrscheinlich. Je näher der Wert an 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Ein Spearmans Rho von 0,6 (wie in Abb. 14) in der Rosazea, weist auf einen deutlichen Zusammenhang hin.

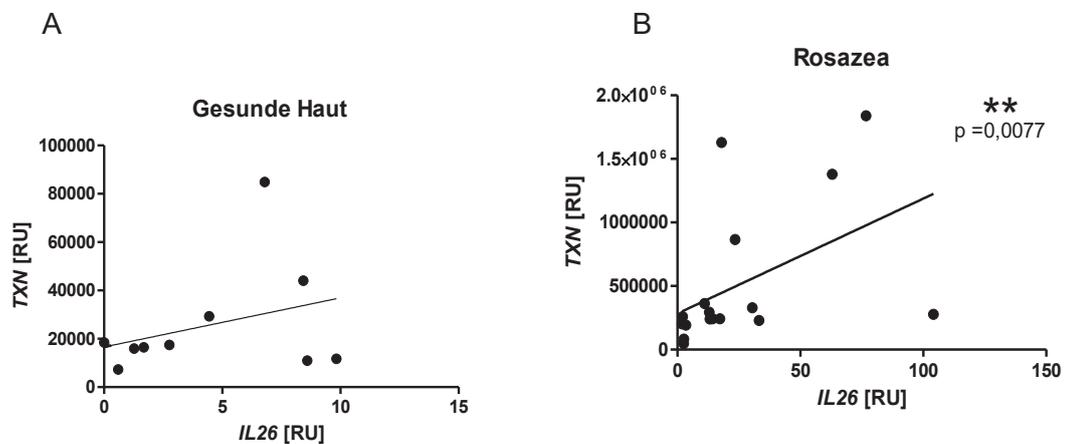


Abb. 14: Korrelationen zwischen *IL26*- und *TXN*-Genexpression in Rosazea und gesunder Haut

A+B, Korrelationsanalyse von *TXN* und *IL26* in gesunder Haut (n=10) (A) und Rosazea (n=17) (B). Statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test. (**, P < 0,01)

3.3.4 Immunhistochemie mit anti-*TXN*-Antikörper

Anschließend wurden Färbungen mittels Immunhistochemie durchgeführt, um die Lokalisation des *TXN*-Proteins in der Rosazea beschreiben zu können. Kryokonservierte Hautstanzen wurden mit anti-*TXN*-Antikörper (3 µg/ml) und Hämatoxylin gefärbt (Abb. 15). In der linken Spalte ist gesunde Haut, in der mittleren und der rechten Spalte Rosazea dargestellt. Die obere Reihe zeigt jeweils die Färbung mit dem anti-*TXN*-Antikörper, die untere Reihe die Färbung mit Immunglobulin IgG₁ zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung. Im Vergleich zu gesunder Haut ist in der Rosazea eine stärkere Färbung

detektierbar. Epidermis, Dermis und Subkutis der Präparate sind gut voneinander abgrenzbar. In der gesunden Haut ist das ubiquitär vorkommende TXN in allen Hautschichten erkennbar, in der Epidermis und Dermis jedoch stärker als in der Subkutis. Auch in der läsionalen Haut der PatientInnen, die an der Rosazea leiden, ist das TXN in allen Hautschichten nachweisbar. Die höchsten Konzentrationen des TXN sind in den Präparaten perivaskulär, in den Bereichen der entzündlichen Infiltrate, erkennbar. Die in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut verstärkte sichtbare Menge an TXN steht im Einklang mit den qPCR Ergebnissen in Abb. 12.

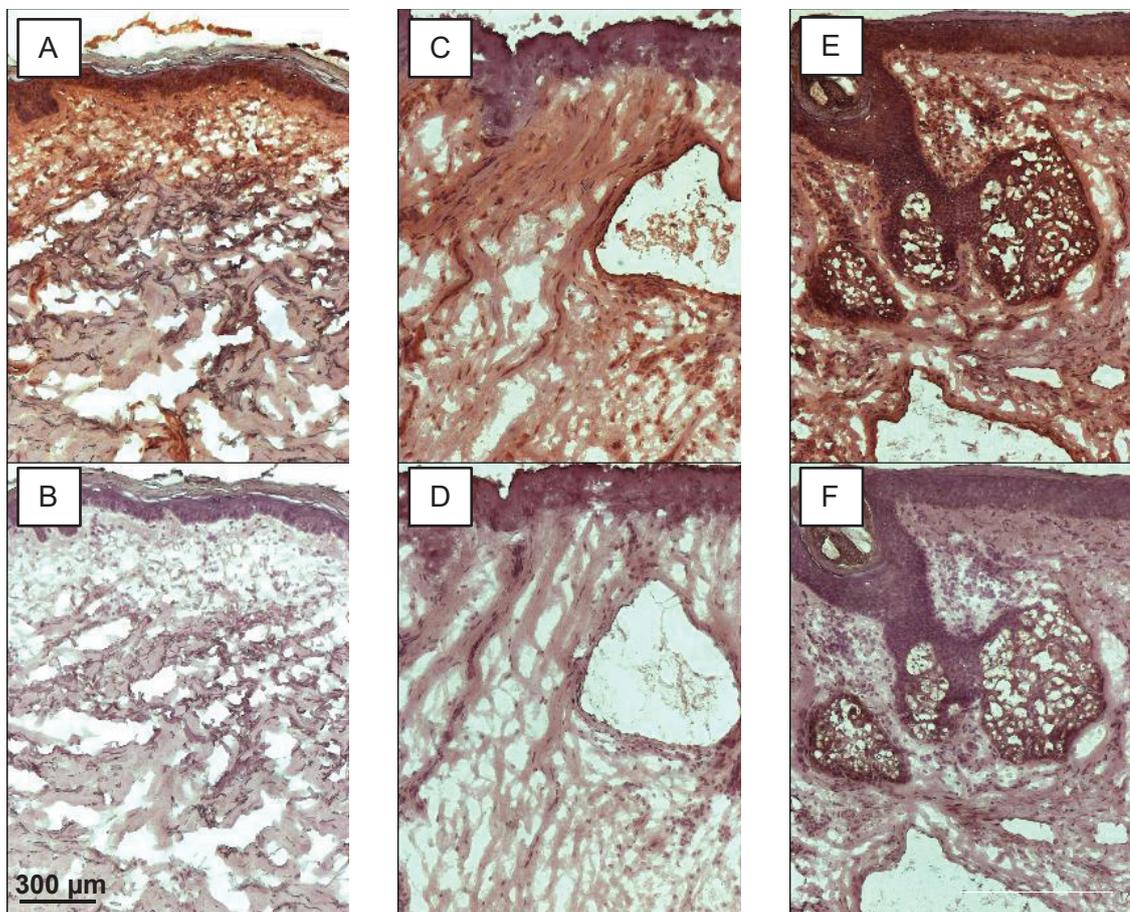


Abb. 15: Thioredoxin ist in gesunder Haut und in Rosazea detektierbar. A-K, Kryokonservierte Hautstanzen wurden mittels Immunhistochemie mit anti-TXN-Antikörper (1:300) und Hämatoxylin gefärbt. Die obere Reihe zeigt die Färbung mit dem anti-TXN-Antikörper, die untere Reihe mit dem Isotyp (IgG₁) zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung. **A-B** gesunde Haut, **C-F** Rosazea. (Vergrößerung: 1:200)

3.3.5 Expression der *TXNRD1* in der Rosazea auf Genebene

Die *TXNRD1* reduziert das verbrauchte TXN-Disulfid zu TXN. Da TXN in der Rosazea signifikant erhöht exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob die *TXNRD1* ebenfalls in veränderter Menge nachweisbar ist. Die Genexpression der *TXNRD1* wurde mittels qPCR quantifiziert. In der Rosazea liegt der Mittelwert bei 1800 RU. In gesunder Haut ist deutlich weniger detektierbar, der Mittelwert beträgt 110 Relative Einheit (*Relative unit*, RU) (Abb. 16). Der P-Wert beträgt 0,0747. Dargestellt wird der Mittelwert \pm SEM.

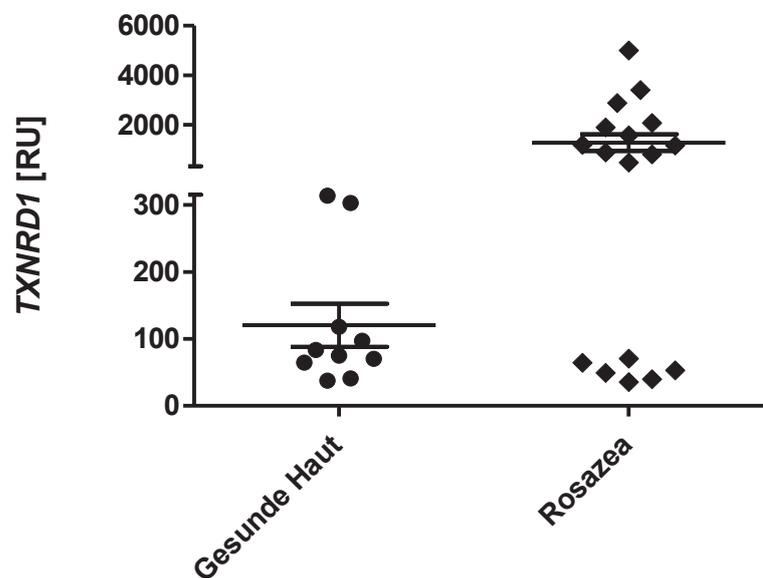


Abb. 16: Expressionsanalyse von Thioredoxinreduktase 1 (*TXNRD1*) in Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut. Die Genexpression von *TXNRD1* wurde mittels qPCR in Hautstanzen von PatientInnen mit Rosazea (n = 17) und gesunden Kontrollen (n= 10), verglichen mit *GAPDH*, analysiert. Statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test, dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.3.6 Korrelation zwischen *IL26*- und *TXNRD1*-Genexpression

Um zu untersuchen, ob in den Präparaten, in denen viel *IL26*-Genexpression detektiert wurde, auch entsprechend viel *TXNRD1* exprimiert wird, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (Abb. 17). Dafür wurden die Ergebnisse der qPCR von *IL26* mit den Ergebnissen von *TXNRD1* in der Rosazea und in gesunder Haut miteinander verglichen. In beiden Graphen entsteht eine leicht

4 Diskussion

Vor dem Hintergrund, dass die genaue Pathogenese der Rosazea aus aktueller Sicht aus mehreren Pfaden besteht, die an vielen Punkten ineinander übergehen, wurde in dieser Arbeit versucht, die Rolle des IL-26 in diesem Kontext zu erforschen. Tatsächlich konnten wir in der Rosazea eine signifikant erhöhte Menge an IL-26 sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene im Vergleich zu gesunder Haut nachweisen und durch ergänzende Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen. Da IL-26 wie das DEFB1 Disulfidbrücken besitzt, deren Aufspaltung unter reduzierenden Bedingungen beim DEFB1 eine deutlich erhöhte Aktivität dieses Defensins bewirkt [19], haben wir untersucht, ob eine Aufspaltung der Disulfidbrücken des IL-26 ebenfalls eine Änderung seiner biologischen Eigenschaften bewirkt. Die Ergebnisse zeigen unter reduzierenden Bedingungen *in vitro* eine signifikant verstärkte Bindung des IL-26 an DNA. Ferner wurde das Vorhandensein reduzierender Bedingungen in der Rosazea am Beispiel eines physiologischen Redoxsystems, bestehend aus TXN und TXNRD1, untersucht. Erstmals konnte TXN auf Gen- und auf Proteinebene signifikant erhöht in der Rosazea nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von *TXN* und *IL26* mRNA korrelierten positiv miteinander. Mittels immunhistochemischer Färbungen zeigte sich das TXN im Vergleich zu der detektierten Menge in gesunder Haut in der Rosazea erhöht und als physiologisches Redoxsystem ubiquitär vorhanden.

Insgesamt wurden 56 Hautproben in diese Studie eingeschlossen, 28 Proben von PatientInnen unterschiedlicher Stadien der Rosazea und 28 Proben von ProbandInnen, bei denen keine Rosazea diagnostiziert wurde. Der Stichprobenumfang dieser Studie ist somit relativ groß.

Um vor allem die Aussagekraft der Korrelationsanalysen (s. Abb. 14) zu erhöhen, könnte versucht werden, noch mehr Proben in die Auswertung einzuschließen. Bei Entnahme menschlicher Hautstanzen besteht die Schwierigkeit, in jeder Probe Epidermis, Dermis und Subkutis in vergleichbaren Anteilen zu erhalten. Des Weiteren erfolgte die Entnahme der Hautstanzen von PatientInnen mit Rosazea aus der zentralen Gesichtsregion, ohne dass eine genauere Lokalisation bekannt wäre. Um die Proben besser miteinander vergleichen zu

können wäre es zwar theoretisch möglich, für die Forschung bei allen PatientInnen Haut aus derselben Region zu entnehmen, klinisch jedoch wäre eine Entnahme von Proben aus reinen Forschungsgesichtspunkten unethisch. So werden der Forschung lediglich Teile der für die Histologie entnommenen Proben zur Verfügung gestellt. Besonders wenn der Leidensdruck der PatientInnen in den Anfangsstadien gering ist, wird eine histopathologische Abklärung der Hautveränderung selten empfohlen, da das klinische Bild allein meist typisch ist und zunächst konservative Diagnostik- und Therapiemaßnahmen ausgeschöpft werden [74].

Dieser Aspekt ist auch für die „gesunden Proben“ von Bedeutung. Da das Spenden gesunder Haut unethisch wäre, stammen die Proben gesunder Haut beispielsweise aus nicht-läsionalen Randbereichen einer Malignomexzision. Diese Proben stammen im Vergleich zu den Proben der PatientInnen mit Rosazea oftmals nicht aus dem Gesichtsbereich.

Die Analysen der Expression der untersuchten Gene erfolgten mittels qPCR. Hier zeigte sich bei *IL26* in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut eine signifikant erhöhte Genexpression mit $P < 0,01$ und damit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1 % (s. Abbildung 7). Bei *TXN* sogar hoch signifikant mit einem P von $< 0,001$. In publizierten Studien wurde ebenfalls die Methode der qPCR zum Nachweis von *IL26* erfolgreich angewendet [40]. Die erhöhte Bildung von *IL26* konnte in der Rosazea auf Genebene bereits durch andere Arbeitsgruppen, hier jedoch mittels *Microarray*, detektiert werden und steht im Einklang mit unseren Ergebnissen [96].

Bei den Ergebnissen der Rosazea fällt eine vermeintliche Verteilung der Proben in zwei Populationen auf, mit Häufungen bei 4 sowie bei 40 RU. Die kleinere Population weist ähnliche Werte wie die gesunde Haut auf und umfasst 5 bis 6 Daten. Bei Betrachtung der Rohdaten wird deutlich, dass sich in dieser Verteilung kein Einfluss der Herkunft der Proben wiederfindet, denn beispielsweise die Proben aus Düsseldorf haben sowohl niedrige als auch hohe Werte ergeben. Des Weiteren waren alle verwendeten Hautproben kaukasischer Herkunft und die Verarbeitung aller Proben identisch, sodass sich keinerlei herkunftsspezifische Einflüsse der Proben auf die Werte eruieren ließen. Einige

Hautstanzen ließen sich auch nach histologischer Untersuchung nicht eindeutig einem Subtyp der Rosazea zuordnen, da die Übergänge fließend sind. Hier könnten in einer Folgestudie im Voraus spezifische Merkmale festgelegt werden, nach denen die einzelnen Proben den entsprechenden Stadien zugeordnet werden könnten.

Die in der Rosazea erhöhte Expression von *IL26* lässt auf eine erhöhte IL-26-Proteinmenge in der Erkrankung schließen. Erwartungsgemäß konnte mittels ELISA in Gewebehomogenisaten mehr IL-26 in Rosazea als in gesunder Haut nachgewiesen werden (Abb. 8). Zudem zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen in der Rosazea eine höhere Fluoreszenz durch anti-IL-26-Antikörper als bei gesunder Haut. Bei Immunfluoreszenzfärbungen, in denen mithilfe von DAPI nur die Zellkerne dargestellt werden, sind auf den Präparaten der Rosazea im Vergleich zu den Präparaten, die aus gesunder Haut angefertigt wurden, deutlich mehr infiltrierende Zellen zu detektieren. Dies ist dadurch erklärbar, dass die Blutgefäße der erkrankten Haut dilatiert sind und sich histologisch perivaskulär und perifollikulär Infiltrate mononukleärer Zellen nachweisen lassen [81, 100]. Dies wird durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die in der Rosazea, im Vergleich zu gesunder Haut, eine erhöhte Zellzahl durch Infiltration der Dermis mit Immunzellen beobachteten, bestätigt [104]. Durch die Entzündungsreaktion und die entstehenden perivaskulären Infiltrate nehmen die Anzahl der aktivierten Immunzellen sowie die Menge der sezernierten Zytokine zu. Bei den stärker fluoreszierenden Arealen im selben Präparat (zum Beispiel G, F, I in Abb. 9) könnte es sich um stärker entzündete Bereiche der Haut handeln. Generell ist jedoch eine Erhöhung der IL-26-Proteinbiosynthese auch in den anderen Präparaten der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut zu beobachten. Auch in anderen T_H17 -assoziierten Hauterkrankungen, wie beispielsweise der Psoriasis, kommt das IL-26 in erhöhten Mengen vor [40]. Bei PatientInnen mit rheumatoider Arthritis wurde ebenfalls ein verstärktes Vorkommen von IL-26 nachgewiesen [43]. Auch diese beiden Erkrankungen sind, wie die Rosazea, mit einer erhöhten Anzahl an T_H17 -Zellen assoziiert [43, 97].

Es wird, wie in Kapitel 1.7. erläutert, versucht, die Pathogenese der Rosazea aktuell durch fünf miteinander interagierende Pfade zu beschreiben. Hierzu zählen eine erhöhte Dichte angeborener neuronaler Hautrezeptoren, neurovaskuläre Veränderungen, ein Ungleichgewicht des Immunsystems, eine vermehrte Entzündungsaktivierung und eine Cathelicidin-induzierte Entzündung. Da beschrieben wurde, dass T_H17-Zellen in der Rosazea vermehrt vorkommen und Keratinozyten den IL-26-Rezeptor exprimieren [96] und wir eine erhöhte Menge an IL-26 sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene in der Rosazea nachweisen konnten, stellte sich die Frage, wie das IL-26 die Pathogenese der Rosazea beeinflussen könnte. Im Folgenden wird eine pathogenetische Beteiligung des IL-26 am Ungleichgewicht des Immunsystems, der vermehrten Entzündungsaktivierung sowie an der Cathelicidin-induzierten Entzündung in der Rosazea diskutiert.

Ein erster möglicher Pfad der Pathogenese der Rosazea ist ein Ungleichgewicht des Immunsystems. Wir konnten in der Rosazea eine Erhöhung des IL-26 auf Gen- und Proteinebene nachweisen. Donnelly *et al.* haben publiziert, dass das IL-26 von T_H1- und T_H17-Zellen produziert wird [39]. Da es sich bei der Rosazea um eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung handelt, dominieren histologisch betrachtet ektatische Blut- und Lymphgefäße, perivaskuläre lymphohistiozytäre Infiltrate, Ödembildung und verdickte elastische Fasern [74]. In allen Subtypen der Rosazea konnte durch Buhl *et al.* insbesondere eine hohe Menge an T-Lymphozyten des Typs T_H1- und T_H17-Zellen nachgewiesen werden [96]. Die T_H17-Zellen, die unter anderem das IL-26 produzieren, sind an vielen Entzündungsprozessen beteiligt. Durch eine stark erhöhte T_H17-Zellantwort können chronische Entzündungen bis hin zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung bei prädisponierten Individuen auftreten [16].

Die erhöhte Anzahl der T_H17-Zellen in der Rosazea und deren Produktion von IL-26 stehen im Einklang zu den Ergebnissen der verstärkten Synthese des IL-26 bei dieser Hauterkrankung. Mithilfe des proinflammatorischen IL-26 könnten die T_H17-Zellen an der Pathogenese der Rosazea maßgeblich beteiligt sein.

Ein weiterer möglicher Pfad der Pathogenese der Rosazea ist eine vermehrte Entzündungsaktivierung. Bei einer chronisch-entzündlichen Hauterkrankung wie der Rosazea, die mit einem ausgeprägten, entzündlichen Infiltrat einhergeht, entsteht durch Zelluntergang mutmaßlich kurzzeitig freie DNA. Durch gerichtete Apoptose entsteht freie DNA zwar nur in sehr geringen Mengen, bei Zelltod durch Nekrose jedoch kann die DNA meist nicht gänzlich und schnell durch Phagozytose eliminiert bzw. durch DNAsen abgebaut werden und die DNA-Fragmente gelangen als freie oder zirkulierende DNA in die Gewebe [112]. Meller *et al.* haben publiziert, dass IL-26 durch seine kationische Ladung an freie DNA binden kann und dass die gebildeten IL-26/DNA-Komplexe pDCs aktivieren können [40]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das IL-26 die IL-26/DNA-Komplexe *in vitro* unter Anwesenheit von DTT suffizienter bilden kann (Abb. 11). DTT bewirkt, dass Sulfhydrylgruppen reduziert werden können, also Disulfidbrücken aufgebrochen werden. Unter der Anwesenheit von DTT wird IL-26 folglich in einen reduzierten Zustand überführt. Die Aufgaben des DTT könnten in entzündeter Haut der Rosazea das System aus TXN und TXNRD1 sowie andere natürliche Redoxsysteme übernehmen und so die Aktivität und Funktion des IL-26 steigern beziehungsweise modifizieren. Es werden unter reduzierenden Bedingungen mehr IL-26/DNA-Komplexe gebildet und folglich können mehr pDCs aktiviert werden. Wenn davon ausgegangen wird, dass in der Rosazea reduzierende Bedingungen herrschen, könnte das IL-26 dort eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Entzündung haben. Dazu würde die Beschreibung anderer Arbeitsgruppen passen, dass in gesundem Gewebe nicht mehr als 0,4 % der peripheren mononukleären Zellen pDCs sind, deren Anteil in der Rosazea mit 10 % jedoch 25-fach erhöht ist [113].

Ferner könnte bei der Pathogenese der Rosazea eine Cathelicidin-induzierte Entzündung eine Rolle spielen. IL-26 könnte hierbei ähnlich wie das LL-37 wirken. Dieses Cathelicidin konnte in der Rosazea ebenfalls erhöht detektiert werden und ist auch in der Lage, pDCs zu aktivieren [103, 105]. Es wurde beschrieben, dass das LL-37 die normalerweise nicht stimulierende körpereigene DNA in der Rosazea in einen potenten Trigger von pDCs umwandeln und die Produktion von IFN- α erhöhen kann [27, 28]. In einem ersten Schritt bindet das

LL-37 durch elektrostatische Interaktionen an die DNA. Das LL-37 ist, wie das IL-26, positiv geladen und kann an die negativ geladene DNA binden. Im zweiten Schritt wird der Komplex aus LL-37 und DNA durch einen bislang nicht bekannten Mechanismus in das endosomale Kompartiment der pDCs aufgenommen und aktiviert dort den TLR9 und die folgende Produktion von IFN- α und anderer proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel TNF, IL-6 und IL-12 [27, 28, 40]. Diese Zytokine aktivieren unter anderem Granulozyten, welche in der Rosazea als verstärkt vorkommend beschrieben werden und in der Lage sind, LL-37 zu produzieren [81]. So kann IL-26 indirekt die Menge an LL-37 erhöhen und auch auf diesem Wege die Exazerbation der Rosazea verstärken. Durch die Exazerbation wird ein reduzierendes Milieu geschaffen, sodass die IL-26/DNA-Komplexbildung gesteigert wird und ein Kreislauf entsteht: IL-26/DNA-Komplexe erhöhen durch indirekte Aktivierung von Granulozyten die Menge an LL-37, welches wiederum durch eine Exazerbation der Entzündung eine stärkere Bindung von IL-26 und DNA bewirkt. Auf die Verstärkung der Entzündung und die erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine folgt eine erhöhte Produktion von IL-26-produzierenden T_H1- und T_H17-Zellen. Durch erhöhte Konzentrationen an IL-26 entsteht wiederum mehr LL-37. Weitere Erforschung der IL-26/DNA-Komplexe, insbesondere deren Nachweis *in vivo*, der bereits für andere AMP-Nukleotid-Komplexe gelungen ist [41], könnte die Grundlage für ein besseres Verständnis der Pathogenese der Rosazea liefern.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass das physiologische Redoxsystem, bestehend aus TXN und TXNRD1, in der Rosazea in größerer Menge vorhanden ist als in gesunder Haut. Um die verstärkte Proteinsynthese genauer zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem anti-TXN-Antikörper durchgeführt. TXN konnte sowohl in gesunder Haut als auch in läsionaler Haut von an Rosazea erkrankten PatientInnen nachgewiesen werden (Abb. 16). Da das TXN von nahezu allen Zellen exprimiert und in den extrazellulären Raum freigesetzt werden kann [64-67], ist es in den Färbungen in allen Hautschichten ubiquitär vorhanden. Diese homogene Färbung erklärt sich aus der ubiquitären Expression dieses Proteins

und entspricht publizierten Färbungen von gesunder Haut sowie von Ileum und Colon [19]. Außerdem scheint die detektierte Menge an TXN in erkrankter Haut schon bei Betrachtung mit bloßem Auge größer zu sein, als die Menge unter physiologischen Bedingungen in gesunder Haut. Besonders in der Subkutis der Rosazea kann ein verstärktes Vorkommen des TXN beobachtet werden. Der Nachweis von TXN in der Haut von PatientInnen mit Rosazea wurde bislang von keiner Arbeitsgruppe publiziert.

Es besteht Grund zu der Annahme, dass in läsionaler Haut von PatientInnen mit Rosazea eine verstärkte Entzündungsaktivität und daraus folgend reduzierende Bedingungen herrschen. Die reduzierenden Bedingungen resultieren in diesem Kontext unter anderem aus Ödemen und Durchblutungsstörungen in entzündetem Gewebe, welche eine Hypoxie herbeiführen [29, 57]. Als Folge dessen beginnen die Zellen mit anaerober Glykolyse und es entsteht durch Ansammlung von Pyruvat und dessen Abbauprodukten eine lokale Azidose [29, 57]. Der pH-Wert in entzündetem Gewebe fällt auf 5,8 [114] und der Sauerstoffpartialdruck von 2,5-9 % auf unter 1 % [115]. Auch in anderen entzündlichen Hauterkrankungen, wie beispielsweise der Psoriasis, kommt es zu einer lokalen Hypoxie [116]. Um die Homöostase trotz der reduzierenden Bedingungen aufrecht zu erhalten, werden von den Zellen verstärkt TXN und TXNRD1 gebildet. Das zu diesem physiologischen Redoxsystem gehörende TXN kann andere Proteine reduzieren, während es selbst oxidiert und dann durch TXNRD1 wieder in seinen Ausgangszustand überführt wird. Es wäre möglich, dass das TXN auch das IL-26 reduzieren kann. Bislang unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten diese Hypothese bestätigen. Beide Moleküle besitzen Cysteine – das TXN zwei und das IL-26 fünf Stück. Beim IL-26 werden vier Cysteine für intramolekulare Disulfidbindungen genutzt und das fünfte steht für die Bildung von Di- und Multimeren zur Verfügung [31, 39, 40]. Die Vermutung des Vorliegens reduzierender Bedingungen in der Rosazea kann durch die erhöhte Menge an TXN begründet werden. Durch das reduzierende Milieu könnte auch das IL-26 reduziert werden und seine biologischen Eigenschaften verändern. Eine dieser Eigenschaften ist die stärkere Komplexbildung des IL-26 mit DNA [40]. Die Idee dahinter basiert auf den

Erkenntnissen für das antimikrobielle Peptid DEFB1. Es weist unter reduzierenden Bedingungen, im Vergleich zu physiologischen Bedingungen, eine deutlich erhöhte Aktivität auf [19]. Dies wird auf die Aufspaltung seiner Disulfidbrücken und die damit einhergehende Strukturänderung zurückgeführt [19]. Da das IL-26 wie das DEFB1 ebenfalls Cysteine mit Sulfhydrylgruppen besitzt, ist eine Stabilisierung der Sulfhydrylgruppen mit einer Stabilisierung der reduzierten Form des IL-26 unter reduzierenden Bedingungen anzunehmen.

Die Ergebnisse von Bertini und seiner Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass TXN verstärkt bei Entzündungen und Infektionen produziert und freigesetzt wird [67], unterstützen unsere Beobachtung der verstärkten Synthese dieses Proteins in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut. Auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen konnte eine Erhöhung des TXN festgestellt werden, beispielsweise bei Psoriasisarthritis in der Synovia und im Serum [117, 118].

Unsere Ergebnisse suggerieren nicht nur eine pathogenetische Beteiligung des IL-26 in der Rosazea, sondern auch eine Verstärkung der proinflammatorischen Effekte des IL-26 unter reduzierenden Bedingungen und werden die Grundlage für die weitere Forschung am IL-26 unter verschiedenen (patho-)physiologischen Bedingungen bieten, um pathomechanismus-basierte therapeutische Ansätze zu erarbeiten. Unter Kenntnis der Moderatoren der Schlüsselmoleküle der Rosazea könnte schon in frühen Stadien gezielt therapeutisch interveniert werden.

Das Modell in Abb. 18 fasst die Ergebnisse und Hypothesen zusammen. Auf der linken Seite ist gesunde Haut dargestellt, rechts die Haut einer an Rosazea erkrankten Person. In der Rosazea verlassen Immunzellen die Blutgefäße und migrieren in das Gewebe zur Lokalisation der Entzündung. Zu den Immunzellen gehören die T-Helferzellen und deren Subpopulationen, unter anderem die T_H1 - und T_H17 -Zellen. Diese beiden T-Zell-Subtypen sind in der Lage, IL-26 zu produzieren. Da das IL-26 aufgrund seiner Kationizität an anionische DNA binden kann, entstehen IL-26/DNA-Komplexe, sofern durch Zelluntergang körpereigene DNA freigesetzt wird [40]. Durch diese Komplexe werden möglicherweise weitere Immunzellen, in der Abbildung pDCs, aktiviert und setzen erhöhte Mengen an Zytokinen frei, beispielsweise das Interferon- α (IFN- α). Weil in der Haut,

insbesondere in Entzündungen, reduzierende Bedingungen vorherrschen [58-61], ist neben dem IL-26 auch eine signifikant erhöhte Menge an TXN und TXNRD1 detektierbar. Da dieses Redoxsystem in der Lage ist, Proteine zu reduzieren, könnte IL-26 in Entzündungen vermehrt in reduzierter Form vorliegen. Reduziertes IL-26 wiederum bindet deutlich besser an DNA als das oxidierte Pendant. Die vermehrte Bildung von Komplexen könnte zu einer gesteigerten Aktivierung von Immunzellen führen und somit den entzündlichen Erkrankungsverlauf verstärken.

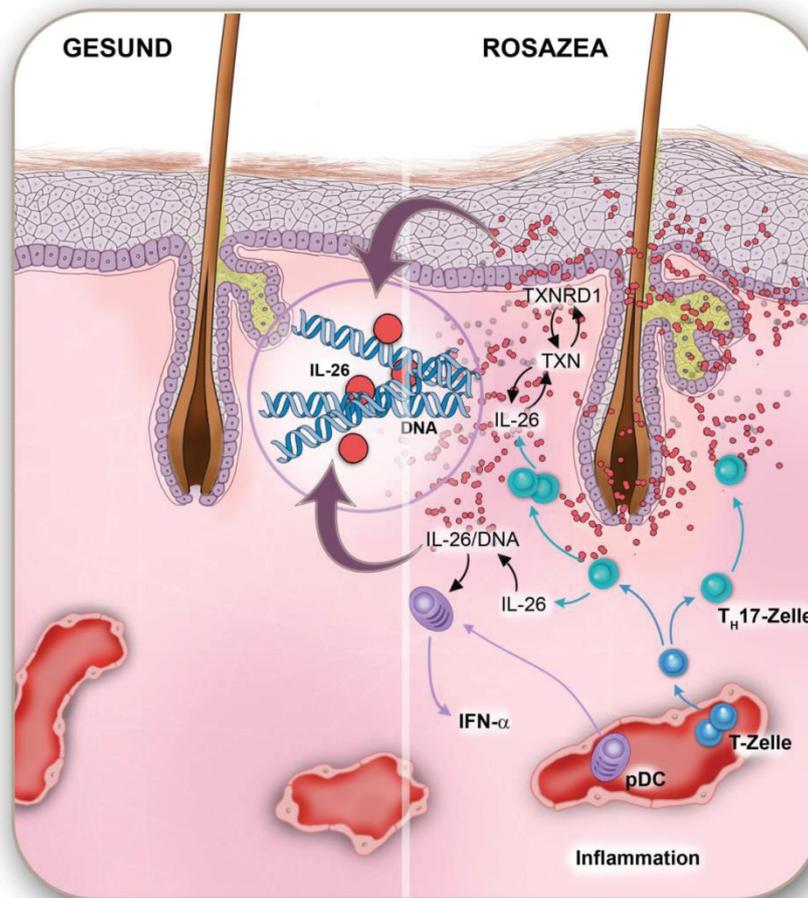


Abb. 18: Reduktion der Disulfidbrücken des IL-26 könnte Immunreaktionen in der Rosazea erleichtern. Links ist gesunde Haut, rechts die Haut einer an Rosazea erkrankten Person dargestellt. T-Helferzellen (T_H -Zellen), vor allem deren Subtyp T_H17 , migrieren aufgrund der chronischen Entzündung aus den Blutgefäßen in das Gewebe und produzieren IL-26. Auch Thioredoxin (TXN) und das Enzym Thioredoxinreduktase (TXNRD1) liegen aufgrund der reduzierenden Bedingungen in größerer Menge vor, als in gesunder Haut. Dabei korrelieren diese Werte positiv mit den Ergebnissen der detektierten Menge an IL-26. Unter reduzierenden Bedingungen kann IL-26 *in vitro* besser an DNA binden. Die IL-26/DNA-Komplexe aktivieren weitere Immunzellen, die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), welche wiederum Mediatoren, wie das Interferon- α (IFN- α), synthetisieren.

© Heike C. Hawerkamp und Holger Schrumpf

Eine kausale Therapie der Rosazea existiert aktuell nicht. Die derzeit angewendeten Präparate haben zwar bei vielen PatientInnen eine lindernde Wirkung, ihr genauer Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht gänzlich erforscht.

Vor allem für die Erythem- und die Phymenstehung gibt es keine umfassenden therapeutischen Möglichkeiten [82]. Das Ziel sollte sein, die Erkrankung in ihrer Gänze zu verstehen und verbesserte, pathomechanismus-basierte Therapien zu entwickeln.

Eine Möglichkeit, das Wissen über das IL-26 therapeutisch zu nutzen, könnte die Synthese und folgend die klinische Erprobung von anti-IL-26-Antikörpern sein. Da das IL-26 in der Rosazea proinflammatorisch wirkt und die Immunreaktionen durch Komplexbildung mit freier DNA verstärkt, könnte bei starker Ausprägung der Rosazea, beispielsweise bei Vorliegen eines Rhino- oder Gnatophyms, ein Antikörper zum Einsatz kommen. Dieser könnte theoretisch das IL-26 binden, weitere Immunreaktionen verhindern und die Symptome lindern. Hier wären jedoch klinische Studien und ein genaues Abwägen von Nutzen und Risiken einer solchen Therapie mit Biopharmazeutika sehr wichtig. Ferner haben Zhang *et al.* publiziert, dass eine Funktion des IL-26 sei, die RANKL-induzierte Osteoklastogenese bei rheumatoider Arthritis zu verhindern und so die PatientInnen vor Knochenabbau zu schützen [116]. Ein anti-IL-26-Antikörper könnte theoretisch die Rosazea lindern, sich jedoch negativ auf den Knochenstoffwechsel auswirken und den Knochenabbau beschleunigen.

Außerdem konnte durch Meller *et al.* demonstriert werden, dass IL-26 antimikrobielle Eigenschaften hat [40]. Ein Antikörper gegen das IL-26 könnte als Nebenwirkung das verstärkte Auftreten bakterieller Infektionen zur Folge haben. Um die Wirkung von IL-26 zu spezifizieren sowie die Injektion des Proteins oder eines Antikörpers *in vivo* zu testen, könnte die weitere Evaluation im Tierversuch sinnvoll sein. IL-26 wird von Mäusen jedoch nicht exprimiert. Es müsste den Tieren zunächst injiziert werden oder nach einem anderen geeigneten Tier gesucht werden [38, 39].

Obwohl das TXN die Wirkung des IL-26 durch das Schaffen reduzierender Bedingungen verstärkt, sollte man dieses Peptid nicht als Angriffspunkt medikamentöser Therapie verwenden. Denn wenn eines der wichtigsten Redoxsysteme des Körpers inhibiert werden würde, hätten die Zellen einen verminderten Schutz vor oxidativem Stress sowie reaktiven Sauerstoffspezies und es käme vermutlich zu Veränderungen des Erbguts und zu einem verstärkten

Zelltod. Des Weiteren ist TXN an weiteren zellulären Prozessen beteiligt, zum Beispiel an der Synthese des Plasmaproteins Albumin [119].

Ein weiterer möglicher Forschungsaspekt wäre die Idee, Studien durchzuführen, welche die Inzidenz oder die Prävalenz von Rosazea bei PatientInnen unter Immunsuppression thematisieren. Unter Immunsuppression müsste die Menge an TH₁₇-Zellen, die das IL-26 produzieren, abnehmen. Es wäre interessant, herauszufinden, ob auch die Rosazea und ihr Ausprägungsgrad sich zwischen gesunden ProbandInnen und PatientInnen, deren Immunsystem supprimiert wird, unterscheiden.

Diesbezüglich wäre auch eine Studie denkbar, die die Prävalenz von Rosazea unter gezielter Suppression von IL-17, beispielsweise durch Therapie mit den anti-IL-17-Antikörpern Secukinumab oder Ixekizumab, bei PatientInnen mit Psoriasis untersucht. Von besonderem Interesse wäre hierbei, ob die TH₁₇-Zellen durch Hemmung einiger ausgewählter Syntheseprodukte kompensatorisch mehr IL-26 freisetzen und die Rosazea triggern würden, oder ob die negative Rückkopplung die Produktion der Zellen hemmen und durch die Verminderung der proinflammatorischen Zytokine auch die Rosazea eindämmen würde. Hierbei wäre ebenfalls interessant zu erforschen, ob externe Stimuli unter gezielter Immunsuppression einen geringeren Einfluss auf die Exazerbation der Rosazea hätten.

Auch die Koinzidenz von Rosazea mit anderen TH₁₇-Zell-assoziierten Erkrankungen, beispielsweise Psoriasis oder der rheumatoiden Arthritis, wäre eine interessante Fragestellung.

Des Weiteren wäre die Detektion der Menge von IL-26 in der Haut von PatientInnen, die sich unter den verschiedenen topischen oder oralen Therapien der Rosazea befinden, im Vergleich zu unbehandelter Haut, von Interesse.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Medzhitov, R. and C.A. Janeway Jr, *Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-298.
2. Matthias Krams, S.O.F., Udo Kellner, Christian Mawrin, *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2013, Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG.
3. Werner Linß, J.F., *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*. 1999, Berlin: Walter de Gruyter.
4. Stappers, M.H., et al., *TLR1, TLR2, and TLR6 gene polymorphisms are associated with increased susceptibility to complicated skin and skin structure infections*. J Infect Dis, 2014. **210**(2): p. 311-8.
5. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2015. **109**: p. 14.12.1-10.
6. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
7. Welsch, U. and T. Deller, *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie, 2. völlig überarbeitete Auflage*. 2006, München, Deutschland: Urban & Fischer, Elsevier GmbH.
8. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
9. Moll, *Dermatologie*. Dermatologie, ed. D. Reihe. Vol. 7. . 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 524.
10. Berger, A., *Th1 and Th2 responses: what are they?* Bmj, 2000. **321**(7258): p. 424.
11. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine, 2014.
12. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
13. Wilson, N.J., et al., *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 950-7.
14. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
15. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
16. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 454-467.
17. Gallo, R.L. and L.V. Hooper, *Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 503-16.
18. Ganz, T. and R.I. Lehrer, *Defensins*. Pharmacology & Therapeutics, 1995. **66**(2): p. 191-205.
19. Schroeder, B.O., et al., *Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human [bgr]-defensin 1*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 419-423.
20. Cowland, J.B., A.H. Johnsen, and N. Borregaard, *hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 173-6.
21. Malm, J., et al., *The Human Cationic Antimicrobial Protein (hCAP-18) Is Expressed in the Epithelium of Human Epididymis, Is Present in Seminal Plasma at High Concentrations, and Is Attached to Spermatozoa*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4297-302.
22. Hase, K., et al., *Cell Differentiation Is a Key Determinant of Cathelicidin LL-37/Human Cationic Antimicrobial Protein 18 Expression by Human Colon Epithelium*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 953-63.

23. De, Y., et al., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells.* J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1069-74.
24. Koczulla, R., et al., *An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18.* J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1665-72.
25. Yamasaki, K. and R.L. Gallo, *The molecular pathology of rosacea.* J Dermatol Sci, 2009. **55**(2): p. 77-81.
26. Gallo, R.L., et al., *Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11035-9.
27. Lande, R., et al., *Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide.* Nature, 2007. **449**(7162): p. 564-569.
28. Stephan, A., et al., *LL37: DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages.* Immunology, 2016.
29. Silverthorn, D.V., *Physiologie, 4. aktualisierte Auflage.* 2009, Hallbergmoos, Deutschland: Pearson Studium, Pearson Deutschland GmbH.
30. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 165-90.
31. Knappe, A., et al., *Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri.* J Virol, 2000. **74**(8): p. 3881-7.
32. Che, K.F., et al., *Interleukin-26 in antibacterial host defense of human lungs. Effects on neutrophil mobilization.* Am J Respir Crit Care Med, 2014. **190**(9): p. 1022-31.
33. Trivella, D.B., et al., *Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family.* Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2909-35.
34. Gad, H.H., et al., *Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family.* J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20869-75.
35. Donnelly, R.P. and S.V. Kotenko, *Interferon-lambda: a new addition to an old family.* J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(8): p. 555-64.
36. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
37. Hernandez, P.P., et al., *Interferon-[lambda] and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection.* Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 698-707.
38. Schoenborn, J.R., et al., *Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma.* Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 732-42.
39. Donnelly, R.P., et al., *Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 393-401.
40. Meller, S., et al., *T17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26.* Nat Immunol, 2015. **16**(9): p. 970-9.
41. Ganguly, D., et al., *Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8.* J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1983-94.
42. Hör, S., et al., *The T-cell Lymphokine Interleukin-26 Targets Epithelial Cells through the Interleukin-20 Receptor 1 and Interleukin-10 Receptor 2 Chains.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(32): p. 33343-33351.
43. Corvaisier, M., et al., *IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation.* PLoS Biol, 2012. **10**(9): p. e1001395.

44. Goris, A., M.G. Marrosu, and K. Vandenbroeck, *Novel polymorphisms in the IL-10 related AK155 gene (chromosome 12q15)*. *Genes Immun*, 2001. **2**(5): p. 284-6.
45. Silverberg, M.S., et al., *Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study*. *Nat Genet*, 2009. **41**(2): p. 216-20.
46. Dambacher, J., et al., *The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation*. *Gut*, 2009. **58**(9): p. 1207-17.
47. Kotenko, S.V., et al., *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2725-32.
48. Sheikh, F., et al., *Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2006-10.
49. Liu, Y., et al., *Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor*. *J Immunol*, 1994. **152**(4): p. 1821-9.
50. Yoon, S.I., et al., *Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(46): p. 35088-96.
51. Ozaki, K., et al., *A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production*. *Science*, 2002. **298**(5598): p. 1630-4.
52. Kotenko, S.V., et al., *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex*. *Embo j*, 1997. **16**(19): p. 5894-903.
53. Biesinger, B., et al., *Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(7): p. 3116-9.
54. Segre, J.A., *Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1150-8.
55. Moll, *Anatomie*, ed. K.-J.M.u.M. Moll. 2006, München: Urban und Fischer.
56. Nguyen, T.V., E.W. Cowen, and K.S. Leslie, *Autoinflammation: From monogenic syndromes to common skin diseases*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2013. **68**(5): p. 834-853.
57. Böcker, W., et al., *Pathologie, 5. vollständig überarbeitete Auflage*. 2012, München, Deutschland: Urban & Fischer, Elsevier GmbH.
58. Hillen, F. and A.W. Griffioen, *Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(3-4): p. 489-502.
59. Ribatti, D. and E. Crivellato, *"Sprouting angiogenesis", a reappraisal*. *Dev Biol*, 2012. **372**(2): p. 157-65.
60. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 677-84.
61. Paolicchi, E., et al., *Targeting hypoxic response for cancer therapy*. *Oncotarget*, 2016.
62. Li, C., et al., *Thioredoxin reductase: a novel, independent prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(19): p. 17792-804.
63. Brown, T.L., H.E. Leman, and B.E. Burston, *Chemie; die zentrale Wissenschaft, 10. aktualisierte Auflage*. 2006, Hallbergmoos, Deutschland: Pearson Studium, Pearson Deutschland GmbH.
64. Nakamura, H., et al., *Chronic elevation of plasma thioredoxin: inhibition of chemotaxis and curtailment of life expectancy in AIDS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2688-93.
65. Scharl, M., M. Gessler, and A.v. Eckardstein, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen, 1. Auflage*. 2009, München, Deutschland: Urban und Fischer, Elsevier GmbH.

66. Wollman, E.E., et al., *Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(30): p. 15506-12.
67. Bertini, R., et al., *Thioredoxin, a Redox Enzyme Released in Infection and Inflammation, Is a Unique Chemoattractant for Neutrophils, Monocytes, and T Cells*. The Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(11): p. 1783-1789.
68. Zou, P., et al., *EF24 induces ROS-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase 1 in gastric cancer cells*. Oncotarget, 2016.
69. Rigobello, M.P. and A. Bindoli, *Mitochondrial thioredoxin reductase purification, inhibitor studies, and role in cell signaling*. Methods Enzymol, 2010. **474**: p. 109-22.
70. Nguyen, P., et al., *Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy*. Cancer Lett, 2006. **236**(2): p. 164-74.
71. Arner, E.S., *Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(6): p. 495-526.
72. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
73. Moravvej, H., et al., *Association of rosacea with demodicosis*. Arch Iran Med, 2007. **10**(2): p. 199-203.
74. Reinholz M, T.K., Kilian K, *Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft: Rosazea*. 2013.
75. Augustin, M., et al., *Prevalence of skin lesions and need for treatment in a cohort of 90 880 workers*. British Journal of Dermatology, 2011. **165**(4): p. 865-873.
76. Braun-Falco, O., et al., *Dermatologie und Venerologie, 5. Auflage*. 2005, Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag
77. Spoenclin, J., et al., *A study on the epidemiology of rosacea in the U.K*. British journal of dermatology, 2012. **167**(3): p. 598-605.
78. Egeberg, A., et al., *Clustering of autoimmune diseases in patients with rosacea*. J Am Acad Dermatol, 2016. **74**(4): p. 667-672.e1.
79. Two, A.M., et al., *Rosacea: Part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2015. **72**(5): p. 749-758.
80. Wilkin, J., et al., *Standard classification of rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea*. J Am Acad Dermatol, 2002. **46**(4): p. 584-7.
81. Aroni, K., et al., *A study of the pathogenesis of Rosacea: how angiogenesis and mast cells may participate in a complex multifactorial process*. Archives of Dermatological Research, 2008. **300**(3): p. 125-131.
82. Holmes, A.D. and M. Steinhoff, *Integrative concepts of rosacea pathophysiology, clinical presentation and new therapeutics*. Exp Dermatol, 2017. **26**(8): p. 659-667.
83. Brinnel, H., et al., *Rosacea: disturbed defense against brain overheating*. Archives of Dermatological Research. **281**(1): p. 66-72.
84. Wilkin, J.K., *Oral thermal-induced flushing in erythematotelangiectatic rosacea*. J Invest Dermatol, 1981. **76**(1): p. 15-8.
85. Higgins, E. and A. du Vivier, *Alcohol intake and other skin disorders*. Clinics in Dermatology, 1999. **17**(4): p. 437-441.
86. Powell, F.C., *Rosacea*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(8): p. 793-803.
87. Mills, C.M. and R. Marks, *Environmental factors influencing rosacea*. Clin Exp Dermatol, 1996. **21**(2): p. 172-3.
88. Krutmann, J., *Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis*. J Dermatol Sci, 2000. **23 Suppl 1**: p. S22-6.

89. Salucci, S., et al., *Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis*. J Photochem Photobiol B, 2014. **141**: p. 1-9.
90. Forton, F. and B. Seys, *Density of Demodex folliculorum in rosacea: a case-control study using standardized skin-surface biopsy*. British Journal of Dermatology, 1993. **128**(6): p. 650-659.
91. Casas, C., et al., *Quantification of Demodex folliculorum by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation*. Experimental Dermatology, 2012. **21**(12): p. 906-910.
92. Elston, C.A. and D.M. Elston, *Demodex mites*. Clin Dermatol, 2014. **32**(6): p. 739-43.
93. Yamasaki, K., et al., *TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(3): p. 688-97.
94. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie, 7. Auflage*. 2009, Heidelberg, Deutschland: Springer Spektrum, Akademischer Verlag.
95. Schwab, V.D., et al., *Neurovascular and Neuroimmune Aspects in the Pathophysiology of Rosacea*. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 2011. **15**(1): p. 53-62.
96. Buhl, T., et al., *Molecular and Morphological Characterization of Inflammatory Infiltrate in Rosacea Reveals Activation of Th1/Th17 Pathways*. Journal of Investigative Dermatology, 2015. **135**(9): p. 2198-2208.
97. Nograles, K.E., et al., *Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1092-102.
98. Chajra, H., et al., *Combination of new multifunctional molecules for erythematotelangiectatic rosacea disorder*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2015. **8**: p. 501-10.
99. Norrby, K., *Mast cells and angiogenesis*. Apmis, 2002. **110**(5): p. 355-71.
100. Smith, J.R., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea*. Br J Ophthalmol, 2007. **91**(2): p. 226-9.
101. Bergendi, L., et al., *Chemistry, physiology and pathology of free radicals*. Life Sci, 1999. **65**(18-19): p. 1865-74.
102. Meyer-Hoffert, U. and J.-M. Schröder, *Epidermal Proteases in the Pathogenesis of Rosacea*. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 2011. **15**(1): p. 16-23.
103. Wantha, S., et al., *Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes*. Circ Res, 2013. **112**(5): p. 792-801.
104. Yamasaki, K., et al., *Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 975-80.
105. Dorschner, R.A., et al., *Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 91-7.
106. Kim, J.E., et al., *Expression and Modulation of LL-37 in Normal Human Keratinocytes, HaCaT cells, and Inflammatory Skin Diseases*. J Korean Med Sci, 2005. **20**(4): p. 649-54.
107. Schaller, M., et al., *Recommendations for rosacea diagnosis, classification and management: update from the global ROSacea COnsensus 2019 panel*. Br J Dermatol, 2019.
108. Siddiqui, K., L. Stein Gold, and J. Gill, *The efficacy, safety, and tolerability of ivermectin compared with current topical treatments for the inflammatory lesions of rosacea: a network meta-analysis*. Springerplus, 2016. **5**(1): p. 1151.

109. Micali, G., et al., *Treatment of erythemato-telangiectatic rosacea with brimonidine alone or combined with vascular laser based on preliminary instrumental evaluation of the vascular component*. *Lasers Med Sci*, 2018. **33**(6): p. 1397-1400.
110. Compton, L.A., G.F. Murphy, and C.G. Lian, *Diagnostic Immunohistochemistry in Cutaneous Neoplasia: An Update*. *Dermatopathology (Basel)*, 2015. **2**(1): p. 15-42.
111. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Meth*, 2012. **9**(7): p. 676-682.
112. van der Vaart, M. and P.J. Pretorius, *The origin of circulating free DNA*. *Clin Chem*, 2007. **53**(12): p. 2215.
113. Brown, T.T., et al., *Comparative analysis of rosacea and cutaneous lupus erythematosus: Histopathologic features, T-cell subsets, and plasmacytoid dendritic cells*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2014. **71**(1): p. 100-107.
114. Punnia-Moorthy, A., *Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and staphylococcus aureus*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 1987. **16**(1): p. 36-44.
115. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(9): p. 609-17.
116. Tao, J., et al., *Expression of GLUT-1 in psoriasis and the relationship between GLUT-1 upregulation induced by hypoxia and proliferation of keratinocyte growth*. *J Dermatol Sci*, 2008. **51**(3): p. 203-7.
117. Batliwalla, F.M., et al., *Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis*. *Mol Med*, 2005. **11**(1-12): p. 21-9.
118. Maurice, M.M., et al., *Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(11): p. 2430-9.
119. Ottaviano, F.G., D.E. Handy, and J. Loscalzo, *Redox regulation in the extracellular environment*. *Circ J*, 2008. **72**(1): p. 1-16.

6 Anhang

6.1 DNA mit DTT

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob die Anwesenheit von DTT die Bindung von *Pico Green* an die DNA beeinflusst. Doch auch bei höheren Konzentrationen des DTT zeigte sich keine Veränderung der gemessenen Intensität (Abb. A1).

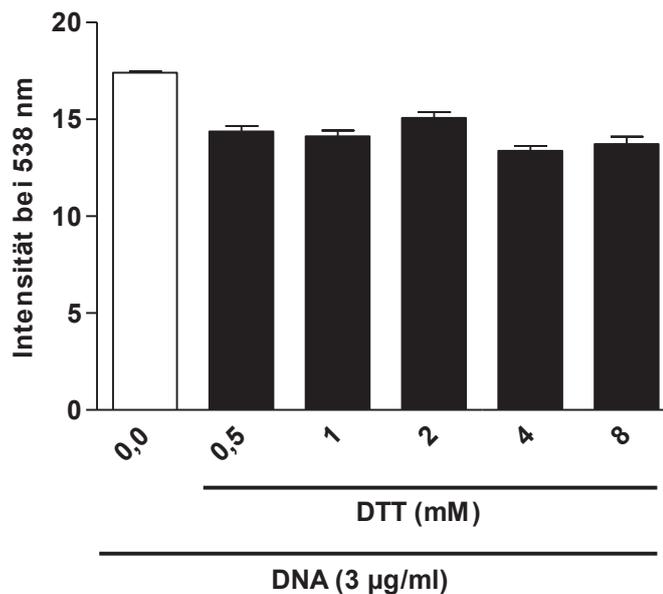


Abb. A1: Die Bindung von *Pico Green* an die DNA ist unabhängig von DTT konstant. Auswertung der Bindung von *Pico Green* an die DNA unter Anwesenheit von DTT. Die Bindung wurde mittels Fluorometrie (538 nm) gemessen.

6.2 Färbungsfotos der Analyse aus Abb. 10

Das erste Bild (Abb. A2) ist eine Färbung mit dem Isotyp Immunglobulin G₁ (IgG₁) als Negativkontrolle auf gesunder Haut. Es steht stellvertretend für alle IgG₁-Bilder, die von jedem Präparat angefertigt wurden. In der linken Spalte wird nur die Färbung mit IgG₁ dargestellt, in der Mitte nur die Färbung mit DAPI, deren Sättigung auf 1 % angehoben wurde, und in der rechten Spalte ein Mischbild. Bei allen Bildern wurde das Hintergrundrauschen mittels *Rolling Ball* gleich intensiv entfernt. Wie bei der Negativkontrolle zu erwarten wäre, wurden auf allen Bildern maximal einige kleine rote fluoreszierende Artefakte gefunden.

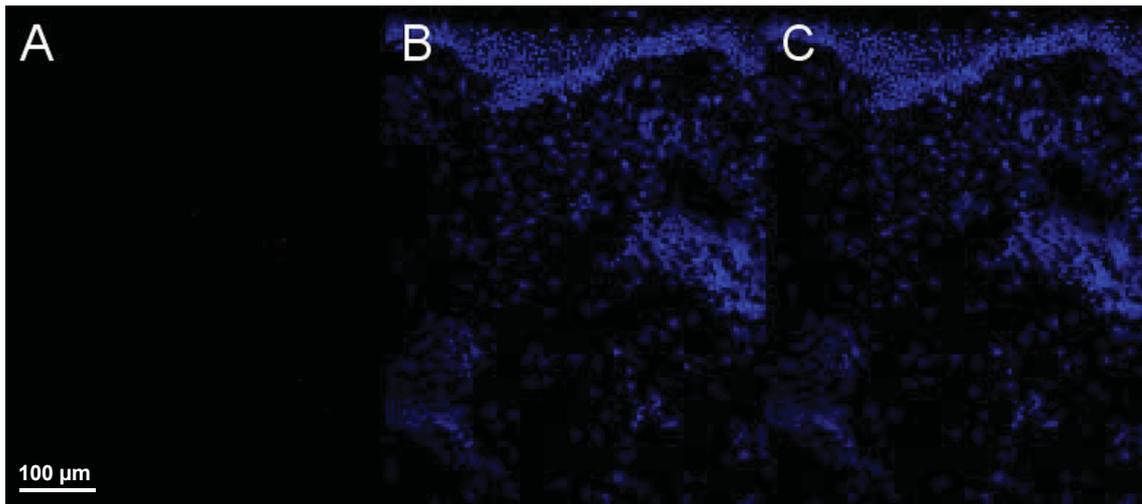


Abb. A2: Immunglobulin G1 (IgG1) gilt als Negativkontrolle. Anstelle von anti-IL-26-Antikörper, wurde in A Isotyp IgG1 zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung auf die Objektträger pipettiert. In der Mitte ist die zugehörige Darstellung der Zellkerne mittels DAPI und in C ein Fusionsbild aus A und B. Vergrößerung: 1:200).

Folgend werden die Fotos der Immunfluoreszenzfärbungen, die in die quantitative Pixelanalyse eingeschlossen wurden, dargestellt. Exemplarisch werden pro Präparat zwei Bilder aufgeführt. In der linken Spalte (A) ist jeweils das Bild nur mit dem anti-IL-26-Antikörper, in der Mitte (B) die Zellkernfärbung mittels DAPI und in der rechten Spalte (C) ein Mischbild. Bei Abb. A3 bis Abb. A10 handelt es sich um die Fotos der Präparate gesunder Haut verschiedener ProbandInnen, bei Abb. A11 bis Abb. A16 um den Subtyp Rhinophym der Rosazea, analog zur gesunden Haut aus Präparaten unterschiedlicher PatientInnen.

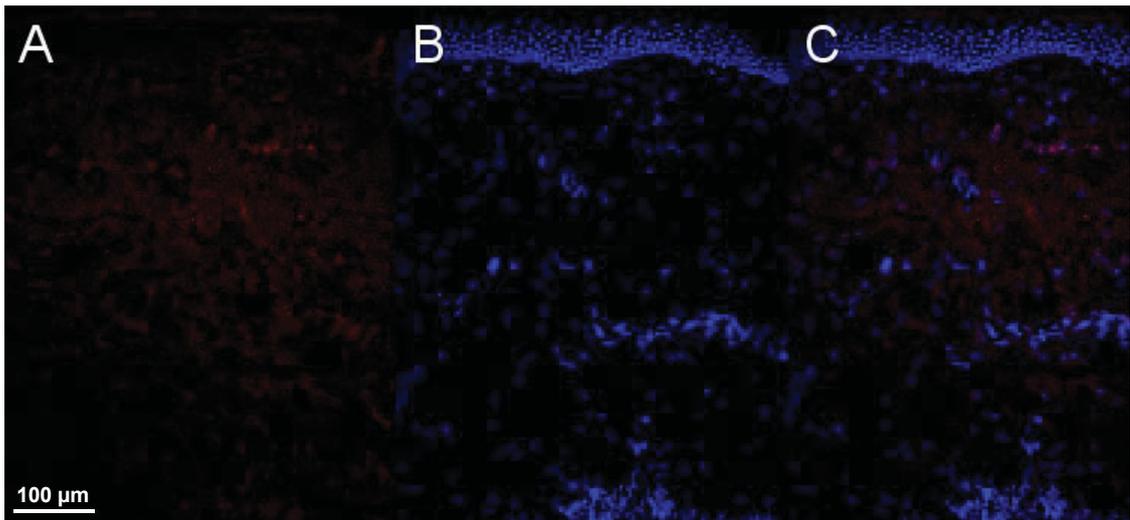


Abb. A3: IL-26 ist in gesunder Haut in geringen Mengen in allen Hautschichten detektierbar. A ist die Färbung mit dem anti-IL-26-Antikörper (Alexa Fluor 555, 5µg/ml), **B** die zugehörige Darstellung der Zellkerne mittels DAPI und **C** ein Fusionsbild aus A und B. (Vergrößerung: 1:200)

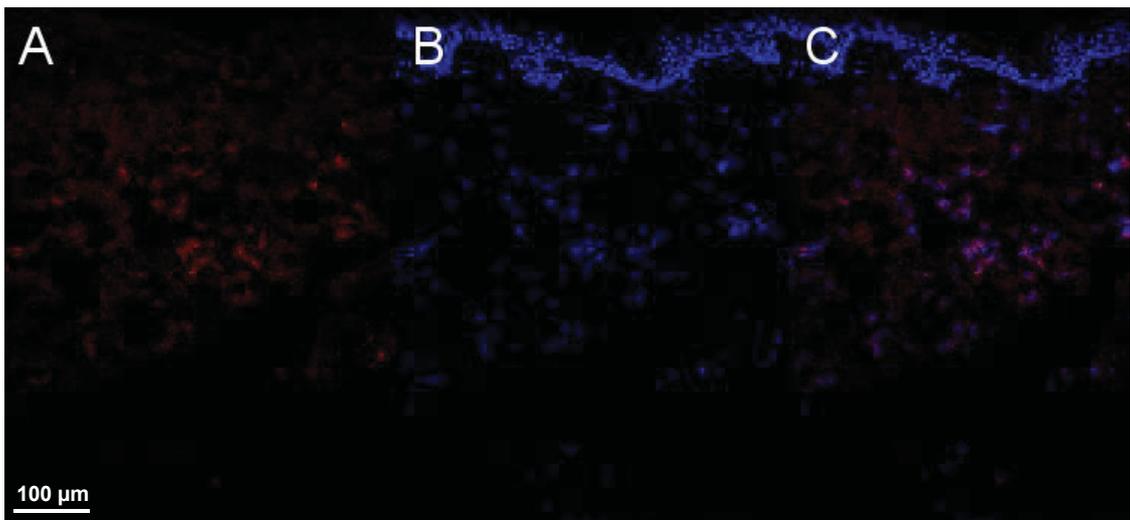


Abb. A4: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

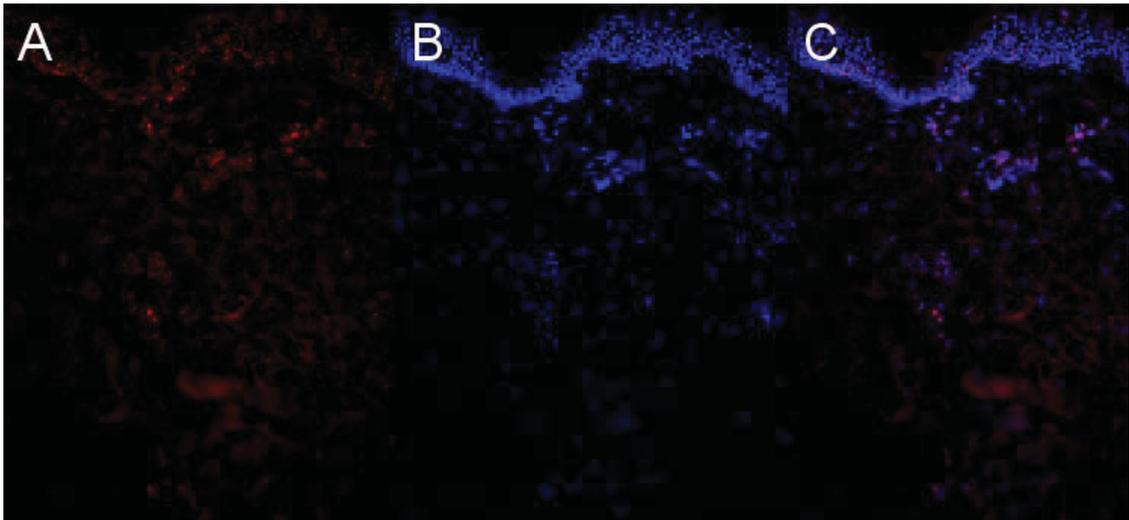


Abb. A5: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

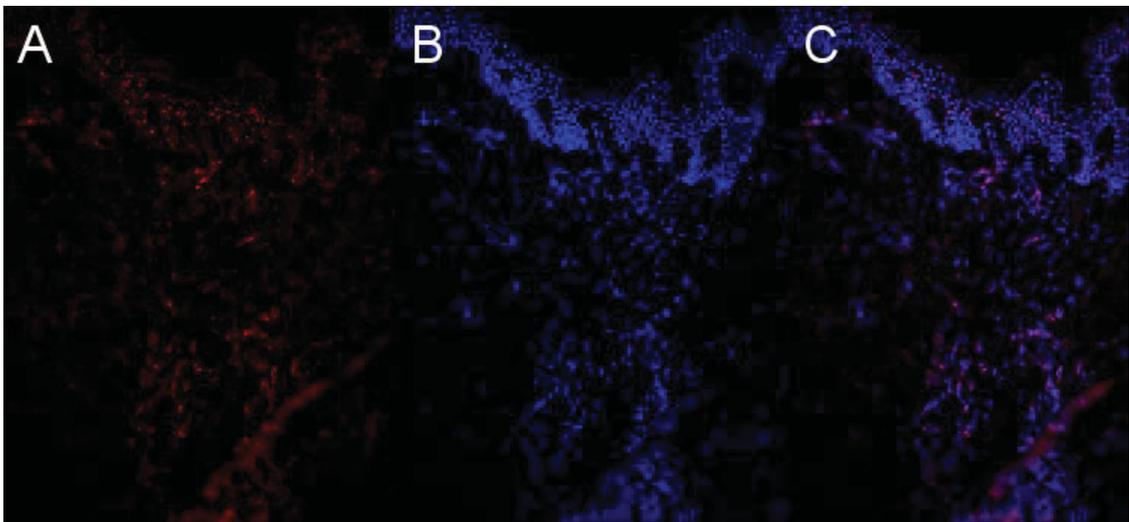


Abb. A6: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

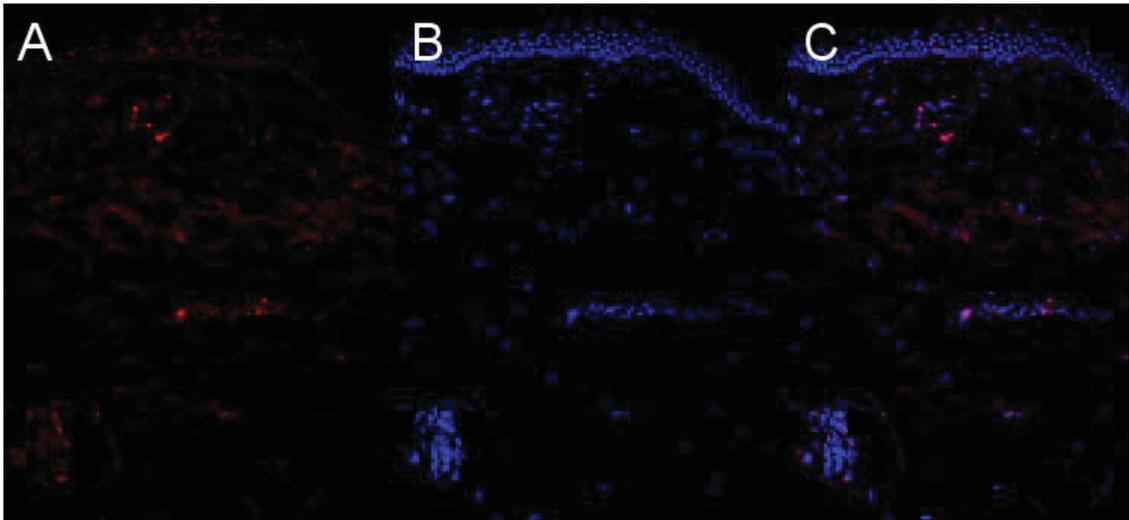


Abb. A7: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

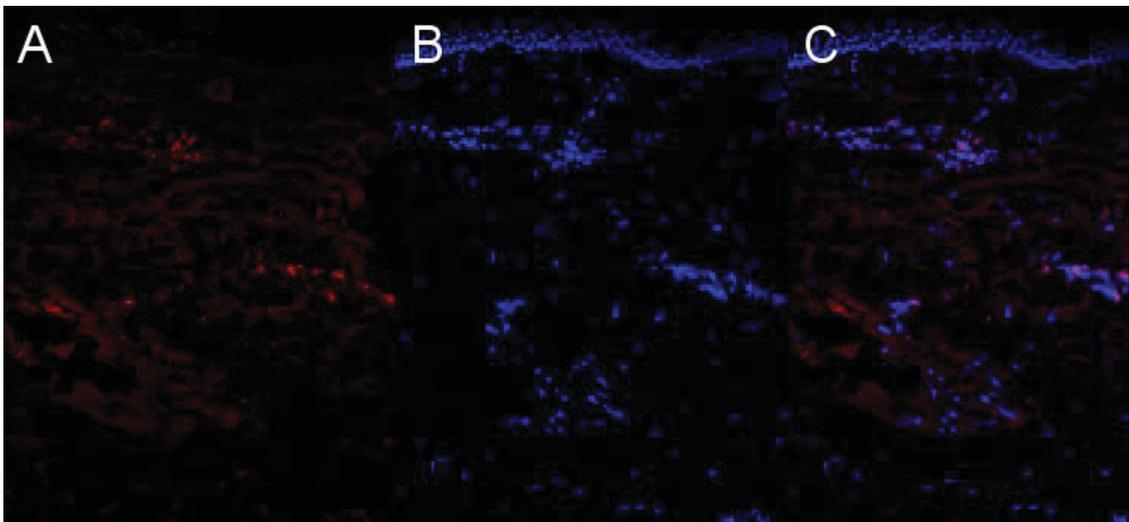


Abb. A8: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

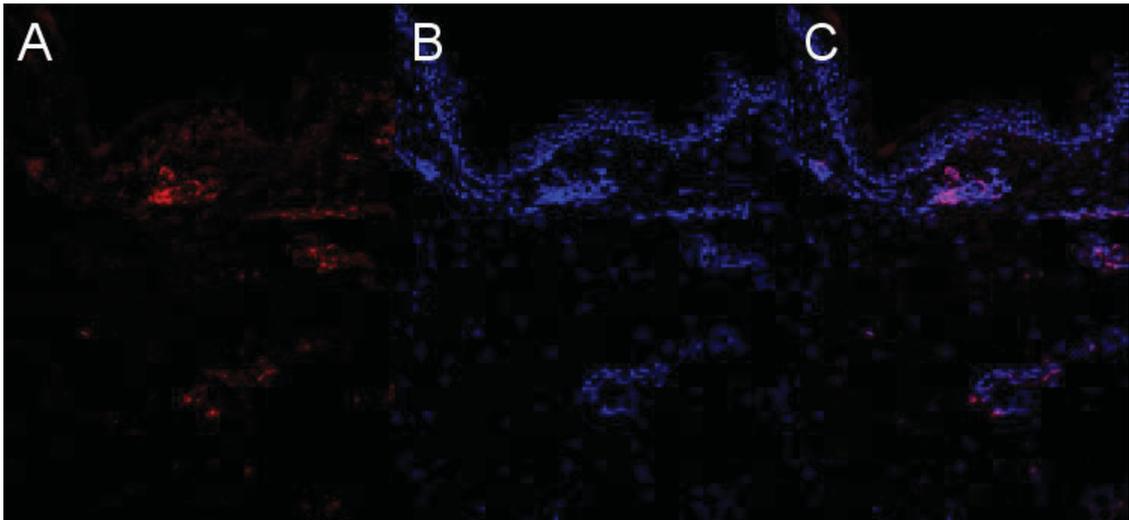


Abb. A9: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

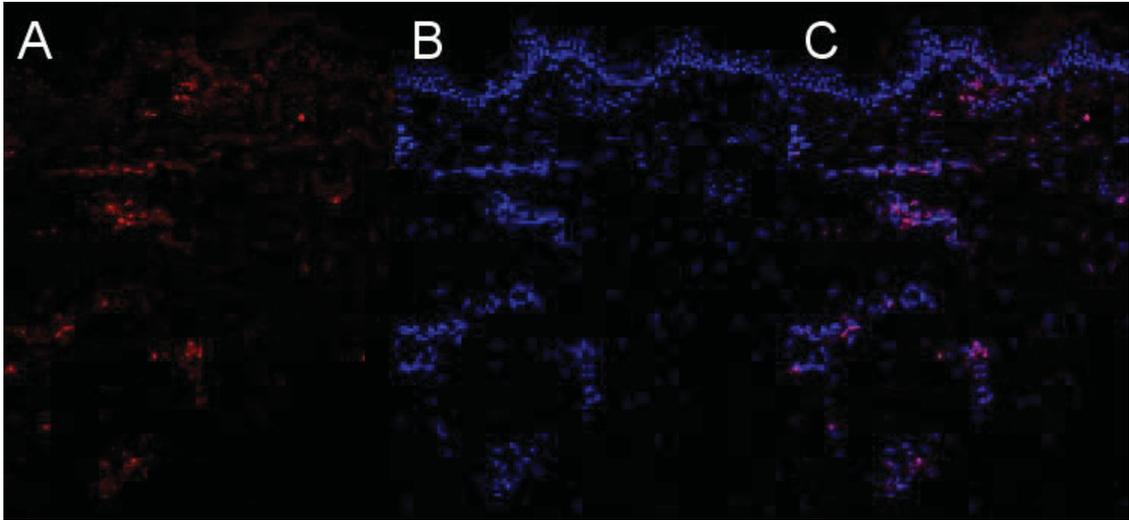


Abb. A10: Gesunde Haut. Siehe Beschreibung von Abb. A3.

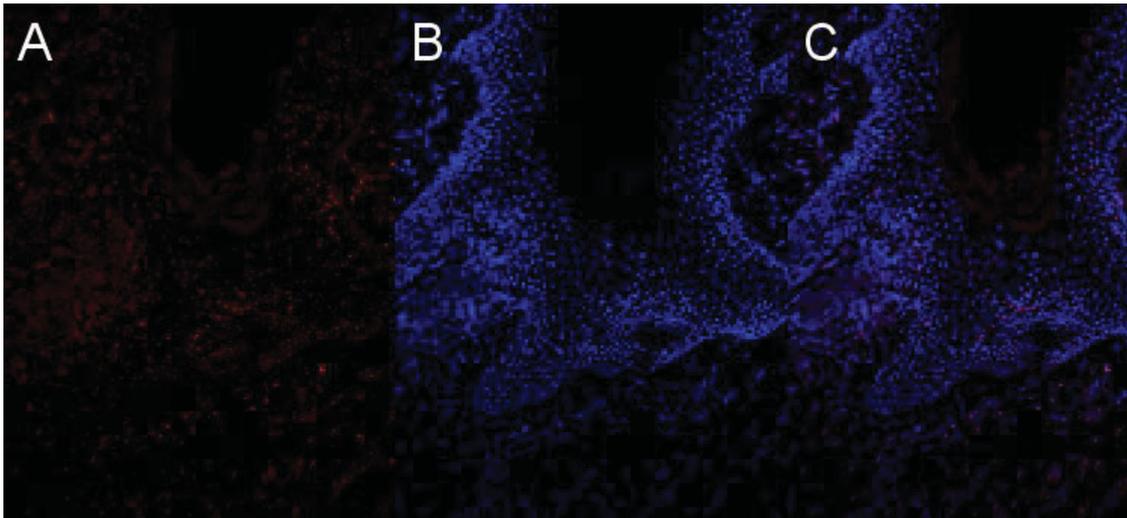


Abb. A11: Rhinophym. IL-26 ist in der Rosazea im Vergleich zu gesunder Haut überexprimiert und liegt in der Rosazea in allen Hautschichten vor. Färbung von kryokonservierten Hautstanzen mittels Immunfluoreszenz, gefärbt mit DAPI (blau, 1:1000) und anti-IL-26-Antikörper (Alexa Fluor 555, 5µg/ml). **A**, nur Alexa Fluor 555, **B**, nur DAPI, **C**, Mischbild der beiden Kanäle. (Vergrößerung: 20fach)

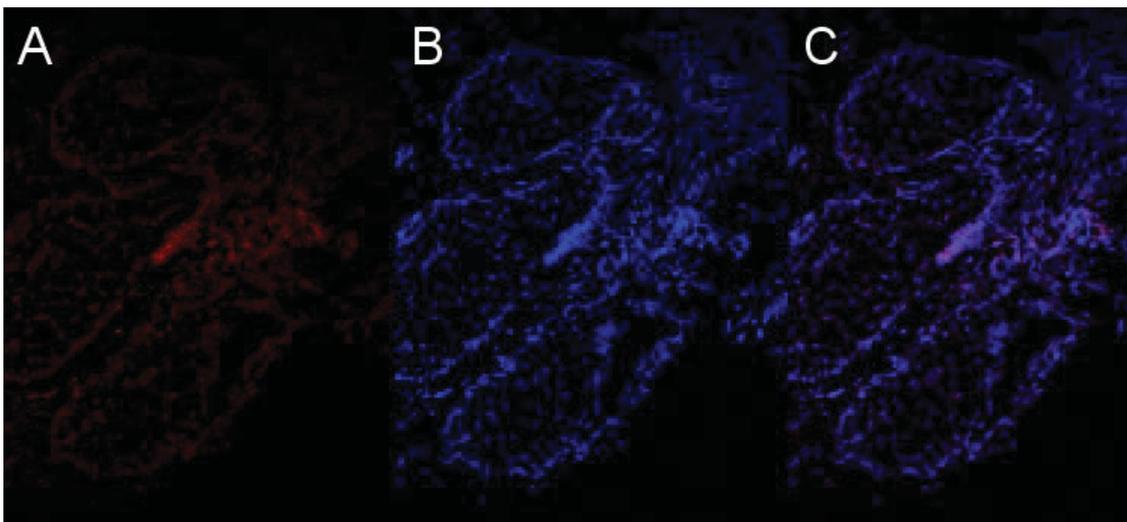


Abb. A12: Rhinophym. Siehe Beschreibung von Abb. A11.

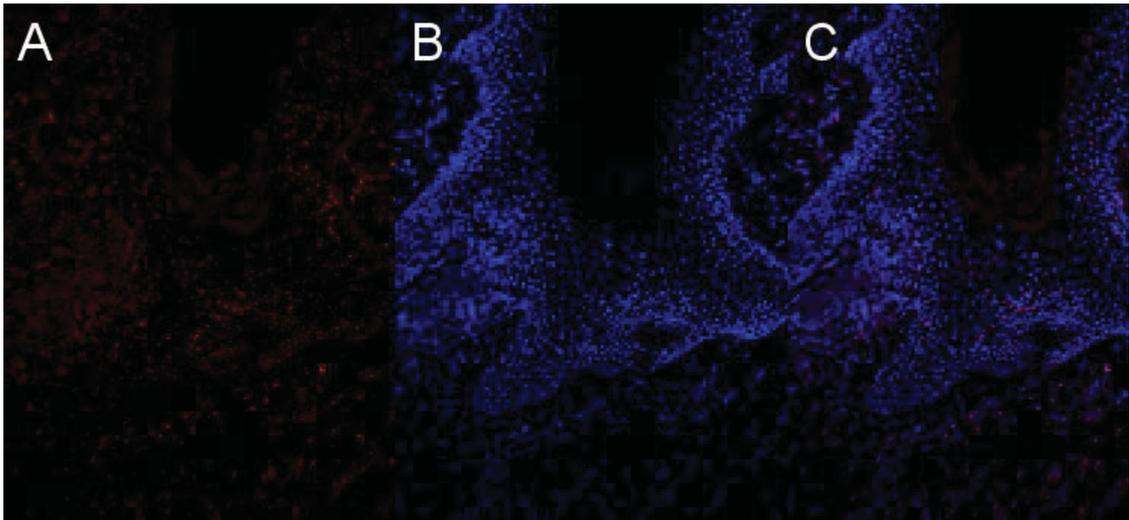


Abb. A13: Rhizophym. Siehe Beschreibung von Abb. A11.

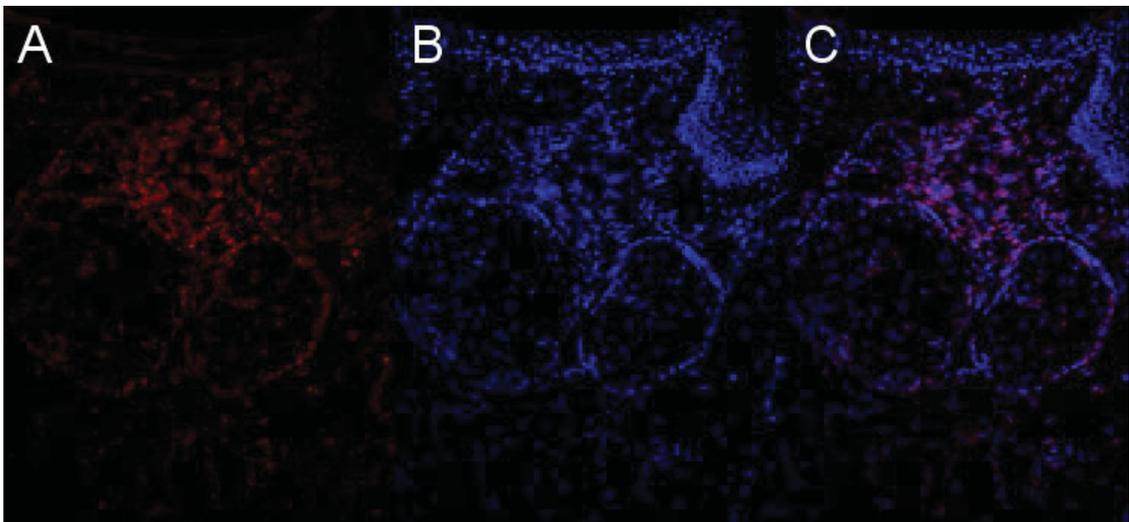


Abb. A14: Rhizophym. Siehe Beschreibung von Abb. A11.

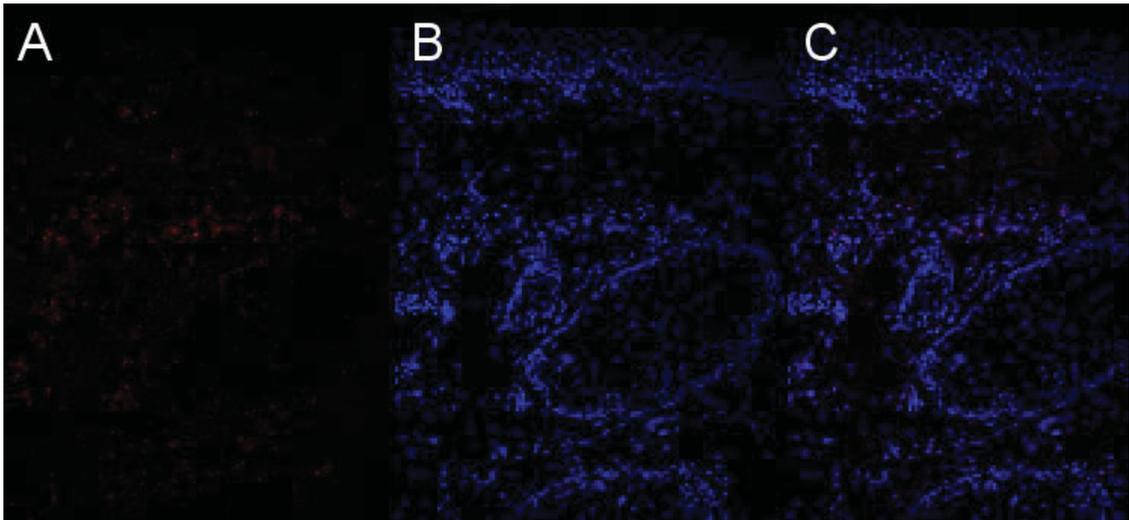


Abb. A15: Rhinophym. Siehe Beschreibung von Abb. A11.

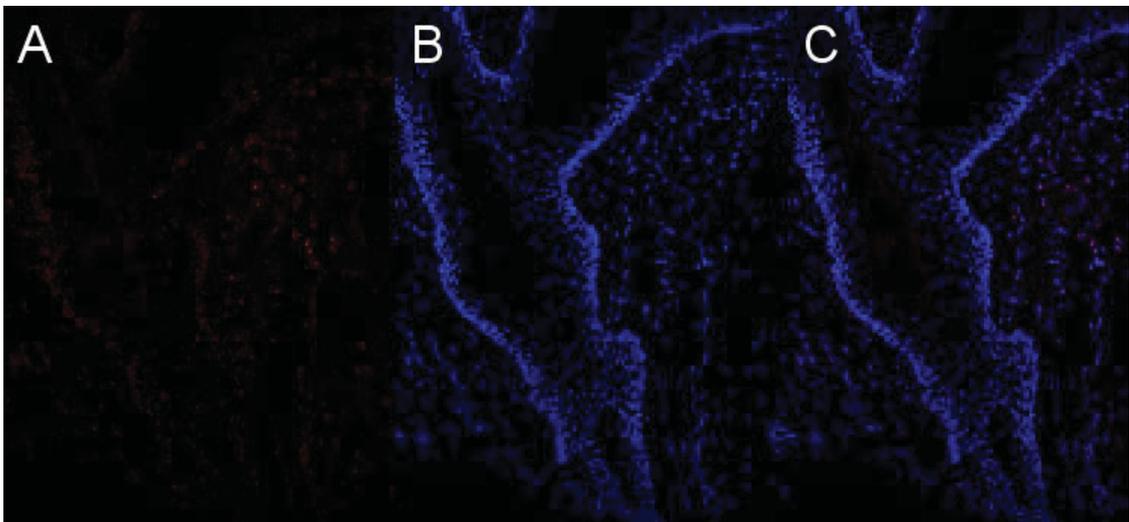


Abb. A16: Rhinophym. Siehe Beschreibung von Abb. A11.

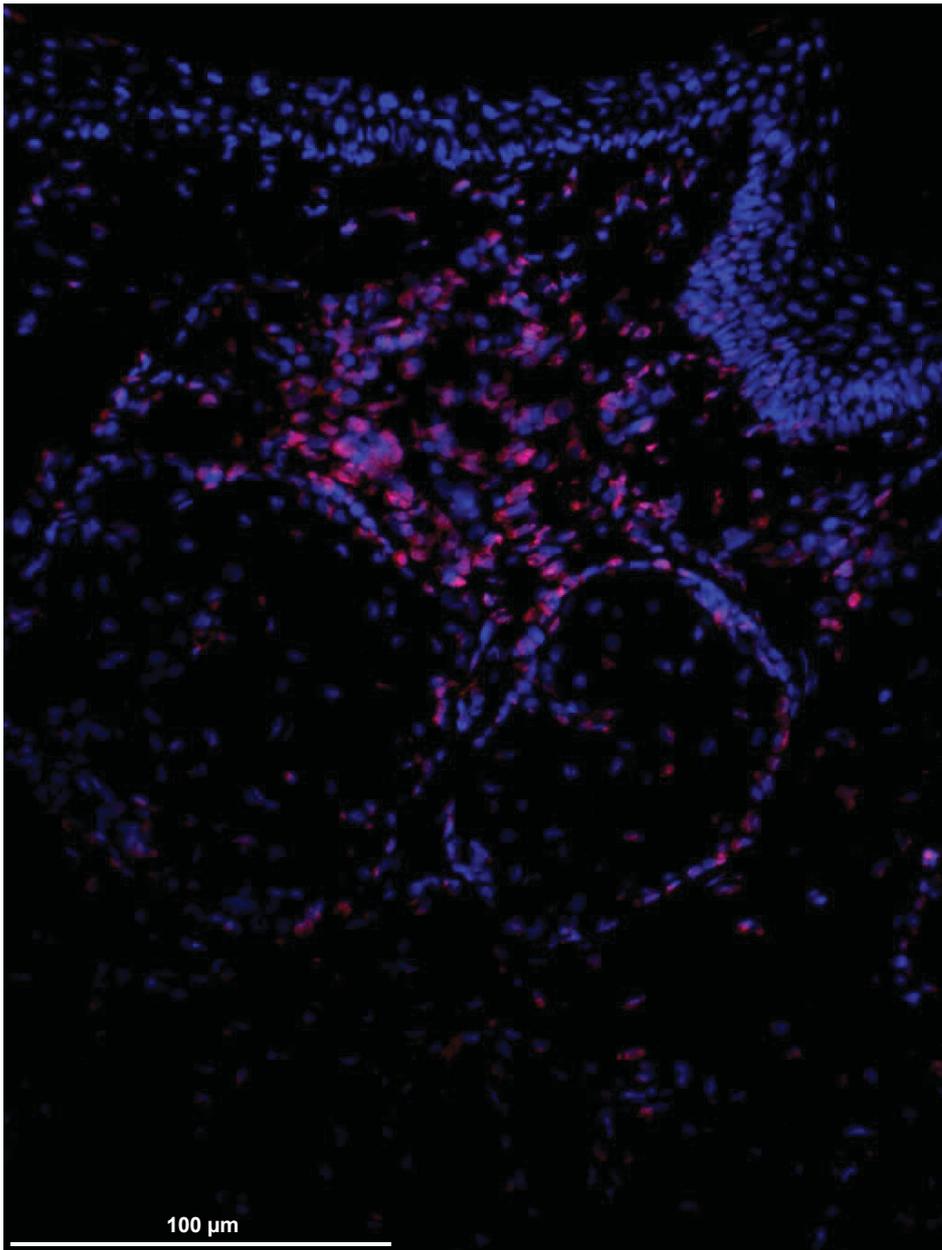


Abb. A17: Vergrößerte Aufnahme eines Ausschnitts aus Abb. A14: Färbungen von kryokonservierten Hautstanzen mittels Immunfluoreszenz, gefärbt mit DAPI (blau, 1:1000) und anti-IL-26-Antikörper (Alexa Fluor 555, 5μg/ml). In der Rosazea sind in der Dermis deutlich perivaskuläre Infiltrate sowie eine vermehrte Gefäßbildung zu beobachten. Das IL-26 liegt spezifisch, zellgebunden vor und scheint vermehrt durch Zellen der Infiltrate produziert zu werden. (Vergrößerung: 1:400)

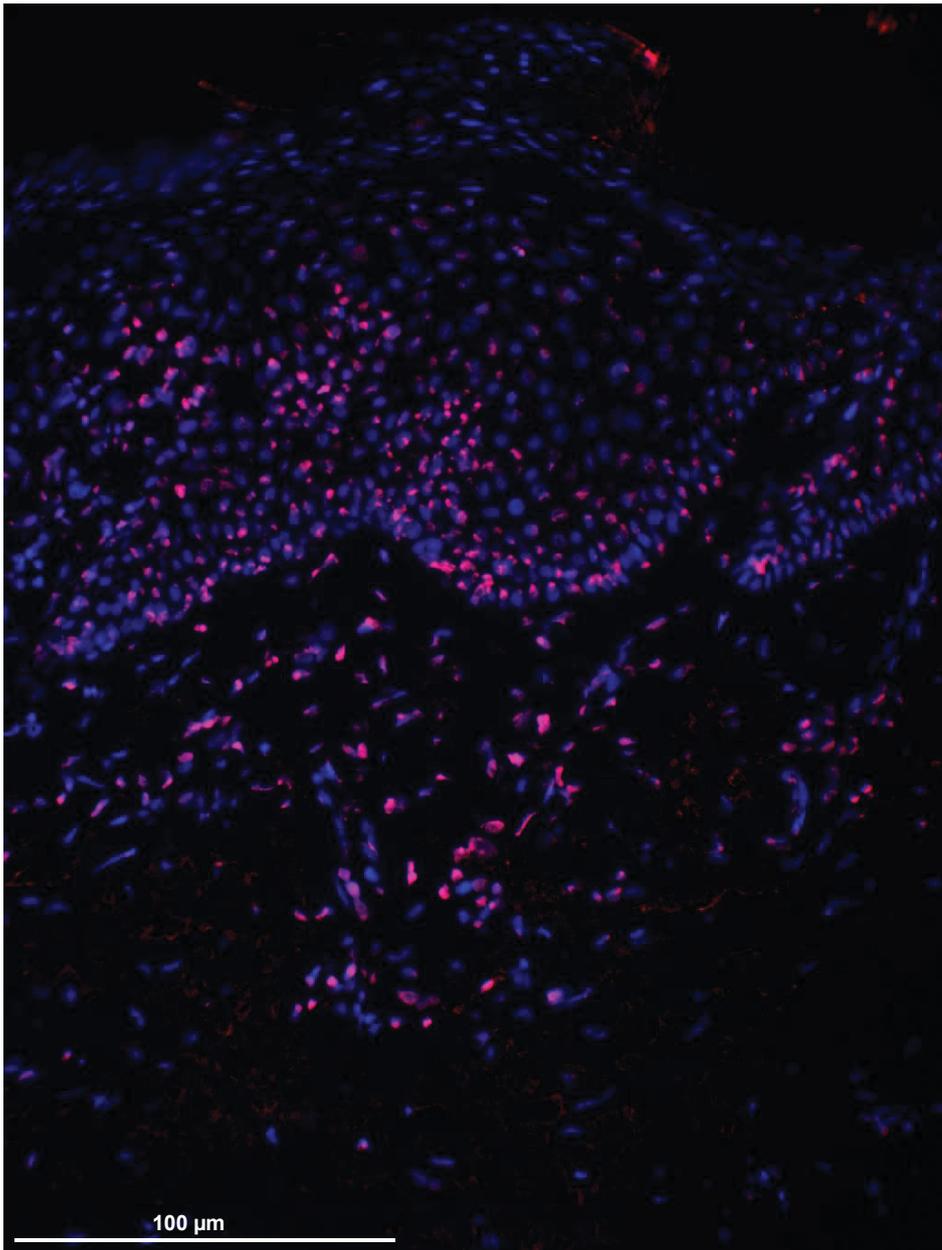


Abb. A18: Immunhistochemische Färbung des anti-IL-26-Antikörpers in der Rosazea. Färbungen von kryokonservierten Hautstanzen mittels Immunfluoreszenz, gefärbt mit DAPI (blau, 1:1000) und anti-IL-26-Antikörper (rot, 5µg/ml). In der unteren Epidermis sowie in der Dermis sind lymphozytäre Infiltrate, die IL-26 produzieren. (Vergrößerung: 1:400)

Danksagung

Ein großes Dankeschön meinem Doktorvater PD Dr. med. Stephan Meller sowie Prof. Bernhard Homey, dass sie mich an diesem interessanten Projekt haben teilhaben lassen und mich stets mit konstruktiven Vorschlägen zur Umsetzung des Projektes unterstützten.

Auch meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. med. Martin Wagenmann möchte ich für seine Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank geht an Heike Hawerkamp, denn ohne ihre hervorragende, intensive Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für deine unerschöpfliche Geduld und für die schöne gemeinsame Zeit!

Des Weiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Forschungslabors der Klinik für Dermatologie für die Freundlichkeit und die Hilfestellung bedanken, mit der sie mich bei Problemen und Fragen jederzeit unterstützt haben.

Ein weiteres Dankeschön geht an die PatientInnen und ProbandInnen für ihre Teilnahme an dieser Studie.

Auch danke ich meinen besten Freundinnen für die Freundschaft und Hilfe und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund für ihre Liebe und Unterstützung danken und für alles, was sie für mich getan haben und tun.