

Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

Charakterisierung der Toll-like-Rezeptor 7 Expression in der Haut bei unterschiedlichen Hauterkrankungen

Nathalie Ritter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Medizin** genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Kilian Eyerich, Ph.D.
2. Prof. Dr. Hermann Wagner

Die Dissertation wurde am 10.04.2019 bei der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.10.2019 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung:

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Charakterisierung der Toll-like-Rezeptor 7 Expression in der Haut bei unterschiedlichen Hauterkrankungen

in der Technischen Universität München unter der Anleitung und Betreuung durch meine Betreuer: Prof. Dr. Kilian Eyerich und Dr. Natalie Garzorz-Stark ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden, nicht einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	2
Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Summary	6
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Das Immunsystem	10
1.2 Das angeborene Immunsystem	10
1.2.1 Pathogen-associated molecular patterns und pattern recognition receptors	11
1.2.2 Toll-like Rezeptoren	13
1.2.2.1 Ein Überblick über die humane TLR-Familie	14
1.2.2.2 TLR – Aufbau des Rezeptors	15
1.2.2.3 TLR – Signalkaskade	17
1.2.3 Toll-like Rezeptoren und Tumoren	19
1.2.3.1 TLR7 Agonist Imiquimod und dessen Rolle in der Tumorthherapie	19
1.3 Imiquimod in der Therapie von Hauterkrankungen	21
1.4 Ziel der Dissertation	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.2 Methoden	30
2.2.1 Epidemiologische Daten	30
2.2.1.1 TLR7-Expression in unterschiedlichen Hauterkrankungen	30
2.2.1.2 TLR7-Expression in malignen epithelialen Tumoren	31
2.2.1.3 TLR7-Expression vor und nach einer Therapie mit Imiquimod	32
2.2.2 Probenentnahme	32
2.2.3 Immunhistochemie	33
2.2.4 Immunfluoreszenz	33
2.2.5 Statistische Auswertung der histologischen Attribute	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Das TLR7-Expressionsmuster in den untersuchten Hauterkrankungen ist heterogen	36
3.2 TLR7-Expression in malignen epithelialen Tumoren	41
3.2.1 TLR7 dient nicht als Marker zur Differenzierung von BCC, SCC und BSC	41
3.2.2 Eine erhöhte TLR7-Expression in SCCs korreliert mit einem höheren Grad der Differenzierung	43
3.2.3 SCC-Tumorzellen und CD2-positive Zellen zeigen keine TLR7-Expression	44
3.3 Die TLR7-Expression steigt nach einer topischen Therapie mit Imiquimod	46
3.3.1 TLR7-Expression korreliert mit einzelnen histologischen Attributen	51
4. Diskussion	53
4.1 Besseres Therapieansprechen bei erhöhter TLR7-Expression?	53
4.2 TLR7 als möglicher Angriffspunkt neuer Therapien	53

4.3	TLR7 – mögliche Rolle in der Ätiologie infektiöser Hauterkrankungen	55
4.4	TLR7 - ein Marker zur Unterscheidung von BCC, SCC und BSC?	56
4.5	Welche Zellen exprimieren TLR7?	57
4.6	TLR im Tumorgebiet – positiv oder negativ prädiktiv?	58
5.	Literaturverzeichnis	60
	Danksagungen.....	69
	Lebenslauf.....	70

Zusammenfassung

Seitdem Toll-like Rezeptoren (TLR) 1985 eher zufällig als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems entdeckt wurden, stehen sie im Fokus der Forschung.

Inzwischen wissen wir, dass TLR nicht nur Oberflächenmoleküle eindringender Pathogene erkennen können, sondern unter bestimmten Umständen auch auf körpereigene Zellen oder auf topisch applizierte Stoffe reagieren. Dies wird sich zum Beispiel in der Therapie von Basalzellkarzinomen (BCC) zunutze gemacht, welche topisch mit einem Wirkstoff namens Imiquimod behandelt werden können. Imiquimod aktiviert TLR7 und setzt dadurch eine Entzündungsreaktion in Gang, durch welche es zu einer Abheilung des vom Tumor betroffenen Areales der Haut kommt.

Wir untersuchten Gewebeproben von Probanden mit BCC (n=6), Condyloma acuminatum (n=1), und bowenoider aktinischer Keratose (n=1) vor und nach einer topischen Therapie mit Imiquimod mittels immunhistochemischer Färbungen auf die Expression von TLR7. Wir konnten zeigen, dass die Applikation von Imiquimod in 75% der von uns untersuchten Fälle zu einem Anstieg der TLR7 Expression führt.

Auch stellten wir mittels immunhistochemischer Färbungen die TLR7-Expression in einer Auswahl der häufigsten Hauterkrankungen dar. Das TLR7-Expressionsmuster zeigte sich als sehr heterogen und eine Clusterbildung anhand der Expression war nicht möglich.

Da spinözelluläre Karzinome (SCC) auf mRNA-Ebene eine deutlich höhere TLR7-Expression als BCC aufzeigen (Muehleisen, Jiang et al. 2012), untersuchten wir die genannten epithelialen Tumoren, sowie den Intermediärtumor, das basosquamöse Karzinom auf die Expression von TLR7 auf Proteinebene. Es zeigte sich, dass sowohl BCCs als auch SCCs im tumoralen und peritumoralen immunozellulären Infiltrat TLR7-positiv anfärbbar sind. So waren 45,8% der SCC-Gewebeproben TLR7-positiv und 30,4% aller BCC-Proben. Als immunhistochemischer Marker zur Differenzierung der genannten Tumorentitäten ist TLR7 folglich nicht geeignet. Jedoch konnten wir bei genauer Betrachtung der unterschiedlich differenzierten SCCs zeigen, dass eine erhöhte TLR7-Expression mit einem höheren Grad der Differenzierung assoziiert ist. Da die Aufgabe und Funktion (besonders in der Karzinogenese) der TLRs auch heute noch

nicht vollständig geklärt ist, bedarf es weiterer Forschung. Unsere Ergebnisse deuten auf eine eher tumorprotektive Funktion von TLR7 hin.

Summary

Since toll-like receptors (TLR) found out to be an important part of the innate immune system they are in focus of research.

Meanwhile we know that TLR are not only able to recognize the surface molecules of pathogens but they also react to endogenous cells or topically applied substances. The reaction to topically applied substances will be for example used in the therapy of basal cell carcinomas (BCC), which can be treated with a substance called Imiquimod. Imiquimod activates the TLR7 and thereby initiates an inflammatory reaction, which leads to a healing of the diseased skin.

We examined tissue samples from subjects with BCC (n=6), condyloma acuminatum (n=1), and bowenoid actinic keratosis (n=1) before and after topical therapy with Imiquimod using immunohistochemical staining for expression of TLR7. We were able to show that the application of imiquimod in 75% of the cases led to an increase in TLR7 expression.

We also visualized TLR7 expression in a selection of the most common skin diseases using immunohistochemical staining. The TLR7 expression pattern was found to be very heterogeneous and clustering based on expression was not possible.

Since spinocellular carcinomas (SCCs) show a significantly higher TLR7 expression than BCC at mRNA level (Muehleisen, Jiang et al., 2012), we examined the epithelial tumors mentioned, as well as the intermediate tumor, the basosquamous carcinoma, on the expression of TLR7 at the protein level. It was shown that both BCCs and SCCs in the tumor and peritumoral immunocellular infiltrate are TLR7-positive stainable. Thus, 45.8% of SCC tissue samples were TLR7 positive and 30.4% of all BCCs. Consequently, TLR7 is not suitable as an immunohistochemical marker for the differentiation of the tumor entities mentioned. However, looking closely at the differentially differentiated SCCs, we were able to show that increased TLR7 expression is associated with a higher grade of differentiation. Since the task and function (especially in carcinogenesis) of TLRs is still not fully understood today, further research is needed. Our results indicate a more tumor-protective function of TLR7.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über derzeit bekannte PRR	12
Tabelle 2: Überblick über die derzeit bekannten humanen TLRs und die sie aktivierenden PAMPs	14
Tabelle 3: Die von uns auf die Expression von TLR7 untersuchten Hauterkrankungen und eine Auswahl der Therapiemöglichkeiten	22
Tabelle 4: Absolute und relative Zahl der TLR7+ Gewebeproben.....	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur eines Toll-like Rezeptors.....	16
Abbildung 2: Signalweg nach TLR-Aktivierung	18
Abbildung 3: TLR7-Expression in den Proben der aktinischen Keratose, der Lentigo maligna, des malignen Melanoms, der Alopezia areata, der Sarkoidose und des Lichen planus ..	39
Abbildung 4: TLR-7-Expression in den Proben der neutrophilen Dermatosen Pyoderma gangraenosum und Vaskulitis	40
Abbildung 5: TLR7-Expression in den Proben der infektiösen Hauterkrankungen Tinea corporis, Acrodermatitis chronica atrophicans, Condyloma acuminata und Verruca vulgaris.....	41
Abbildung 6: TLR7 Anfärbarkeit von hoch differenzierten SCCs im Vergleich zu niedriger differenzierten SCCs	44
Abbildung 7: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von TLR7, AE1&AE2, DAPI und CD2	45
Abbildung 8: TLR7-Expression in der Haut vor und nach der topischen Therapie mit Imiquimod.....	50
Abbildung 9: Relative TLR7-Expression vor und nach einer Therapie mit Imiquimod bei BCCs, condyloma acuminatum und bowenoider aktinischer Keratose	51
Abbildung 10: TLR7-Expression in Korrelation mit histologischen Parametern	52

Abkürzungsverzeichnis

Aa2-Rezeptor	Adenosin-2a-Rezeptor
AP-1	Activation protein 1
BCC	Basalzellkarzinom
Ber-EP4	Ep-CAM/Epithelial Specific Antigen
BSC	Basosquamöses Karzinom
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptoren
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cyrtidin-Guanosin-Dinukleotide
CU	Colitis ulzerosa
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DCP	Diphenylcyclopropenone
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
FU	Fluorouracil
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HMGB1	High-mobility group box 1
HPV	Humane Papillomviren
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
IRF 3	Interferon response factor 3
LE	Lupus erythematoses
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like-Rezeptoren
MCMV	Muriner Zytomegalievirus
mRNA	Messenger RNA

PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
PIM	Phosphatidylmyo-inositol Mannoside
PRR	Pattern-Recognition Receptor
RLR	RIG-like-Rezeptoren
RNA	Desoxyribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
SCC	Spinozelluläres Karzinom
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SR	Scavenger-Rezeptoren
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
TIR	Toll-Interleukin-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Täglich kommen wir mit einer Vielzahl potenziell pathogener Keime, wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen in Berührung. Dass wir nur selten lebensbedrohlich krank werden, haben wir unserem Immunsystem zu verdanken. Dieses schafft es uns zu schützen indem es I. Pathogene und mögliche Infektionen entdeckt und II. die detektierte Infektion kontrolliert und im besten Fall den Erreger eliminiert (Murphy, Travers et al. 2008).

Unterteilt wird das Immunsystem in ein angeborenes und in ein erworbenes System. Das immunologische Gedächtnis bildet das erworbene Immunsystem. An der ersten Reaktion des Körpers auf Pathogene ist maßgeblich das angeborene Immunsystem beteiligt.

1.2 Das angeborene Immunsystem

Die Zellen der Haut und der Schleimhäute bilden gegenüber der äußeren Umwelt eine physische und chemische (durch die Sekretion von antimikrobiellen Enzymen und Peptiden) schützende Barriere. Schafft es ein Erreger jedoch diese Barriere zu durchbrechen, so kommt er in Kontakt mit den Zellen des angeborenen Immunsystems. Zu diesen Zellen zählen unter anderem phagozytierende oder dendritische Zellen. Entdecken sie ein Pathogen, so kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion und das Pathogen wird phagozytiert und dadurch unschädlich gemacht, oder durch die Sezernation von Zyto- und Chemokinen, reaktiven Sauerstoff-Spezies oder reaktiven Stickstoff-Verbindungen zerstört. Auch virusinfizierte Zellen werden, nachdem die Infektion detektiert wurde, vermittelt durch Chemokine von *natürlichen Killerzellen* (NK-Zellen) angegriffen. Aber nicht nur körperfremde Zellen werden erkannt. Ebenfalls werden Moleküle von geschädigten oder toten Zellen des Wirtes detektiert, obwohl diese nichtmikrobiellen Ursprungs sind (Abbas, Lichtman et al. 2011).

Das angeborene Immunsystem ist folglich für die erste, schnelle Reaktion des Organismus auf infektiöse Erreger verantwortlich. Eindringende Erreger verraten sich durch spezielle, auf ihrer

Oberfläche befindliche Strukturen, die Pathogen assoziiert sind und auf die im nächsten Abschnitt weiter eingegangen wird.

1.2.1 Pathogen-associated molecular patterns and pattern recognition receptors

Das angeborene Immunsystem kann hoch konservierte Strukturen von körperfremden Molekülen erkennen. Diese werden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) genannt (Janeway 2013).

Es gibt drei Eigenschaften die PAMPs auszeichnen:

PAMPs werden nur vom Pathogen und nicht vom Wirt produziert.

PAMPs sind hoch konserviert und essenziell für das Überleben des Pathogens.

Bestimmte PAMPs sind häufig in einer Gruppe von Pathogenen enthalten.

Beispiel: Alle gramnegativen Bakterien enthalten Lipopolysaccharide (LPS) in ihrer äußeren Zellwand. Wenn LPS erkannt werden, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Erreger um ein gramnegatives Bakterium handelt (Medzhitov and Janeway 2000).

Wie im Abschnitt 1.2 bereits erwähnt erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems unter bestimmten Umständen auch körpereigene Zellen. Dies ist der Fall, wenn die körpereigenen Zellen durch Infektionen, aber auch steril, zum Beispiel durch Verbrennung oder chemische Toxine geschädigt werden. In diesem Fall kommt es zum Auftreten von mit Zellschädigung assoziierten Molekülen. Genannt werden diese Moleküle *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Zellen die durch den normalen Weg der Apoptose sterben, sezernieren keine DAMPs (Matzinger 1994, Chen and Nunez 2010, Abbas, Lichtman et al. 2011).

Erkannt werden PAMPs und DAMPs von bestimmten mustererkennenden Rezeptoren, den *pattern-recognition receptors* (PRR). Diese Rezeptoren sind keimbahnkodiert und weisen damit, im Gegensatz zu Rezeptoren des erworbenen Immunsystems, eine genetisch festgelegte Selektivität auf, welche sich im Laufe der Evolution entwickelte. Da sich große Pathogengruppen bestimmte PAMPs teilen (s.o.), ist es einer kleinen Gruppe von Rezeptoren möglich eine Vielzahl von Mikroorganismen zu erkennen (Medzhitov and Janeway 2000).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit bekannten PRRs, welche unter anderem in die Gruppe der löslichen, der membranständigen und zytoplasmatischen PRRs eingeteilt werden können.

Tabelle 1: Überblick über derzeit bekannte PRR

Beispielhafter PRR	Lokalisation	Funktionale immunologische Eigenschaft	Referenz
Lösliche PRRs			
Mannose-bindendes Lektin	Gelöst im Blutplasma	Oponierung von bakteriellen und viralen PAMPs und anschließend Aktivierung des Komplementsystems.	(Medzhitov and Janeway 2000, Geginat 2014)
Surfactant-Proteine	Gelöst im alveolaren Raum	Oponierung von bakteriellen und fungalen PAMPs ohne die Aktivierung des Komplementsystems.	(Geginat 2014)
C3 – Teil des Komplementsystems	Gelöst im Blutplasma	Detektion bakterieller PAMPs → alternativer Weg der Komplementaktivierung	(Abbas, Lichtman et al. 2011)
Membranständige PRRs			
Toll-like Rezeptoren	Membranständig in der äußeren Zellmembran sowie in intrazellulären Membranen	Bindung von bakteriellen, viralen, fungalen und parasitären PAMPs sowie DAMPs direkt. → Aktivierung von Signaltransduktionswegen (TLR) → Phagozytose des Pathogenes (CLR,SR)	(Geginat 2014, Hoving, Wilson et al. 2014) (Zani, Stephen et al. 2015)
C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs)			
Scavenger-Rezeptoren (SR)			
Zytoplasmatische PRRs			
NOD-like-Rezeptoren (NLRs)	Im Zytoplasma von Phagozyten und anderen Zellen	Sensoren von bakteriellen PAMPs (NLR) Sensoren von viraler RNA und DNA und von bakterieller DNA (RLR&ALR). Detektion von Pathogenen, die in die Zelle eindringen konnten oder über Phagozytose aufgenommen wurden. → Aktivierung von Signaltransduktionswegen und Detektion von <i>danger associated molecular patterns</i> (DAMPs), die im Falle eines Zelltodes sezerniert werden.	(Abbas, Lichtman et al. 2011, Geginat 2014, Motta, Soares et al. 2015, Gray, Winship et al. 2016)
RIG-I-like Rezeptoren (RLRs)			
AIM-like receptors (ALRs)			

1.2.2 Toll-like Rezeptoren

Im Jahre 1985 entdeckte Christiane Nüsslein-Volhard bei der Forschung an Taufliegen (*Drosophila melanogaster*), dass manche der Fliegenlarven anders aussahen als der Rest. Der ventrale Anteil der Larven war im Gegensatz zum dorsalen Teil unterentwickelt. Sie und ihre Arbeitsgruppe fanden heraus, dass dafür die Mutation eines rezeptorkodierenden Gens verantwortlich ist, welches sie „Toll“ nannten (Hansson and Edfeldt 2005). Einige Jahre später zeigte sich, dass erwachsene Taufliegen, welche eine Mutation des Toll-Genes aufwiesen, Infektionen durch Pilze nicht überlebten (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Das durch Nüsslein-Volhard entdeckte Toll-Gen schien neben der Rolle in der Embryogenese der Taufliegen auch noch eine wichtige immunologische Rolle zu spielen. Mehr als zehn Jahre nach der Entdeckung von Toll wurde das Interesse an den Toll-Rezeptoren noch größer als Medzhitov et al. Parallelen des Toll-Rezeptors zu einem ähnlichen Rezeptor und Kaskaden im angeborenen Immunsystem von Säugetieren und Pflanzen fanden (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Der dem Toll ähnliche Rezeptor bekam den entsprechenden Namen: *Toll-Like Rezeptor* (TLR). Man fand heraus, dass der damals entdeckte TLR4 dazu in der Lage ist die Lipopolysaccharide in der Membran von gramnegativen Bakterien zu erkennen und die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen zu induzieren (Lemaitre, Nicolas et al. 1996, Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997).

Heute kennen wir eine ganze Familie von membrangebundenen TLRs (TLR1-TLR13) von denen TLR 1-10 im menschlichen Körper vorkommen. Die verschiedenen TLRs erkennen unterschiedliche PAMPs und DAMPs und inzwischen konnte jedem Mitglied der humanen TLR-Familie (außer TLR10) das dazugehörige PAMP zugeordnet werden. Einen Überblick über die Familie der humanen TLRs verschafft Tabelle 2 im nächsten Abschnitt.

TLR können grob in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe, zu der TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 gehören, befindet sich in der Membran der Zelloberfläche. Die PAMPs dieser Gruppe sind vor allem mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine (Kawai and Akira 2010). Die Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 befinden sich intrazellulär, innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, von wo aus sie über den Golgi-Apparat, in intrazelluläre Vesikel wie Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen wandern. Ihre PAMPs sind hauptsächlich Nukleinsäuren (Chockalingam, Brooks et al. 2009, Blasius and Beutler 2010, Kawai and Akira 2010).

Neben körpereigenen Zellen (Akira, Uematsu et al. 2006) scheinen TLRs auch in der Membran von Krebszellen exprimiert zu werden. Ob dies eine eher tumorproliferative und –suppressive Auswirkung hat ist derzeit noch nicht vollständig geklärt.

1.2.2.1 Ein Überblick über die humane TLR-Familie

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die derzeit bekannten humanen TLRs und über eine Auswahl der sie aktivierenden PAMPs und DAMPs.

Tabelle 2: Überblick über die derzeit bekannten humanen TLRs und die sie aktivierenden PAMPs

Rezeptor	Aktivierendes PAMP oder DAMP	Quellen
TLRs in der Membran der Zelloberfläche		
TLR1	Lipoproteine Vorkommend in grampositiven und –negativen Bakterien	(Alexopoulou, Thomas et al. 2002)
TLR2	Lipoteichonsäuren (LTA) Vorkommend in der Zellmembran grampositiver Bakterien Lipoproteine Lipoglycane Bestandteile der Zellwand von Mykobakterien Glycolipide – Phosphatidylmyoinositol Mannoside (PIMs) Vorkommend in der Zellwand von Mykobakterien Glykoprotein Hämagglutinin (H-Protein) Vorkommend in der Virushülle des Masernvirus Zytomegalievirus-Virionen DAMP: high-mobility group box 1 (HMGB1), Heat shock proteins (HSP)	(Alexopoulou, Thomas et al. 2002, Bieback, Lien et al. 2002, Compton, Kurt-Jones et al. 2003, Gilleron, Quesniaux et al. 2003, Akira, Uematsu et al. 2006, Abbas, Lichtman et al. 2011, Tsung, Tohme et al. 2014)
TLR1-TLR2 Heterodimer	Triacylierte Lipopeptide aus gramnegativen Bakterien und Mykoplasmen	(Akira, Uematsu et al. 2006)
TLR2-TLR6 Heterodimer	Diacylierte Lipopeptide aus gramnegativen Bakterien und Mykoplasmen	(Akira, Uematsu et al. 2006)
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) vorkommend auf der Zellmembran gramnegativer Bakterien Fusionsprotein des respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) umhülltes Virus aus der Familie der Pneumovirinae Pneumolysin des Streptococcus pneumoniae Paclitaxel Zytostatisches Medikament DAMP: high-mobility group box 1 (HMGB1), HSP	(Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997, Kurt-Jones, Popova et al. 2000, Akira, Uematsu et al. 2006, Abbas, Lichtman et al. 2011, Tsung, Tohme et al. 2014)
TLR5	Flagellin Protein Proteinkomponente des Filaments in den Geißeln von grampositiven und –negativen Bakterien	(Hayashi, Smith et al. 2001)

TLRs in der Membran von Endosomen		
TLR3	Doppelsträngige RNA (dsRNA) Assoziiert mit viralen Infektionen als Replikationszwischenprodukt von ssRNA-Viren oder als Nebenprodukt der Transkription von DNA-Viren Vorkommend in: Murinen Zytomegalievirus (MCMV) Virale einzelstrang-RNA (ssRNA) Beispiel: Hepatitis C Virus (HCV)	(Alexopoulou, Holt et al. 2001, Tabeta, Georgel et al. 2004, Akira, Uematsu et al. 2006, Li, Li et al. 2012)
TLR7	Imidazolquinolone Wie zum Beispiel Imiquimod Virale ssRNA Aus RNA Viren Bakterielle RNA	(Hemmi, Kaisho et al. 2002, Diebold, Kaisho et al. 2004, Heil, Hemmi et al. 2004, Eberle, Sirin et al. 2009)
TLR8	Imidazolquinolone Virale ssRNA	(Diebold, Kaisho et al. 2004, Heil, Hemmi et al. 2004, Gorden, Qiu et al. 2006)
TLR9	Nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive) Bestandteil bakterieller und viraler DNA Beispielsweise: MCMV, Hepes simplex Virus(HSV)-1und HSV-2 Haemozoin Auch „Malariapigment“ genannt, entsteht beim Abbau von Hämoglobin durch Malaria Parasiten DAMP: HMGB1	(Hemmi, Takeuchi et al. 2000, Hartmann, Endres et al. 2001, Lund, Sato et al. 2003, Hochrein, Schlatter et al. 2004, Tabeta, Georgel et al. 2004, Coban, Ishii et al. 2005, Tsung, Tohme et al. 2014)
TLR10	PAMP derzeit nicht bekannt Spielt möglicherweise eine Rolle in er Detektion von Influenzaviren, sowie bei der Detektion von Listeria monocytogenes	(Regan, Nally et al. 2013, Lee, Kok et al. 2014, Jiang, Li et al. 2016)

1.2.2.2 TLR – Aufbau des Rezeptors

Nachdem im vorherigen Abschnitt erläutert wurde was TLRs sind und was ihre Aufgabe ist, soll der folgende Abschnitt eine Vorstellung davon geben, wie diese besonderen Rezeptoren aufgebaut sind.

TLRs sind Typ-1-Transmembranproteine, durchqueren die Phospholipiddoppelschicht einer Membran einmal vollständig und bestehen aus einer extrazellulären-, einer transmembran- und einer intrazellulären-Domäne (Bell, Mullen et al. 2003, Voet, Voet et al. 2010). Die

extrazelluläre Domäne wird aus 16-28 (Matsushima, Tanaka et al. 2007) leucinreichen Wiederholungen gebildet (Medzhitov and Janeway 2000, Bell, Mullen et al. 2003, Blasius and Beutler 2010) und ist für die Erkennung von PAMPs und DAMPs verantwortlich. Die Signalweiterleitung erfolgt durch die intrazelluläre Domäne, welche bei allen TLRs eine so genannte Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne ist. Diese wird aufgrund der Sequenzähnlichkeit zwischen dem Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 und dem *Drosophila melanogaster* protein Toll so genannt (Gay and Keith 1991).

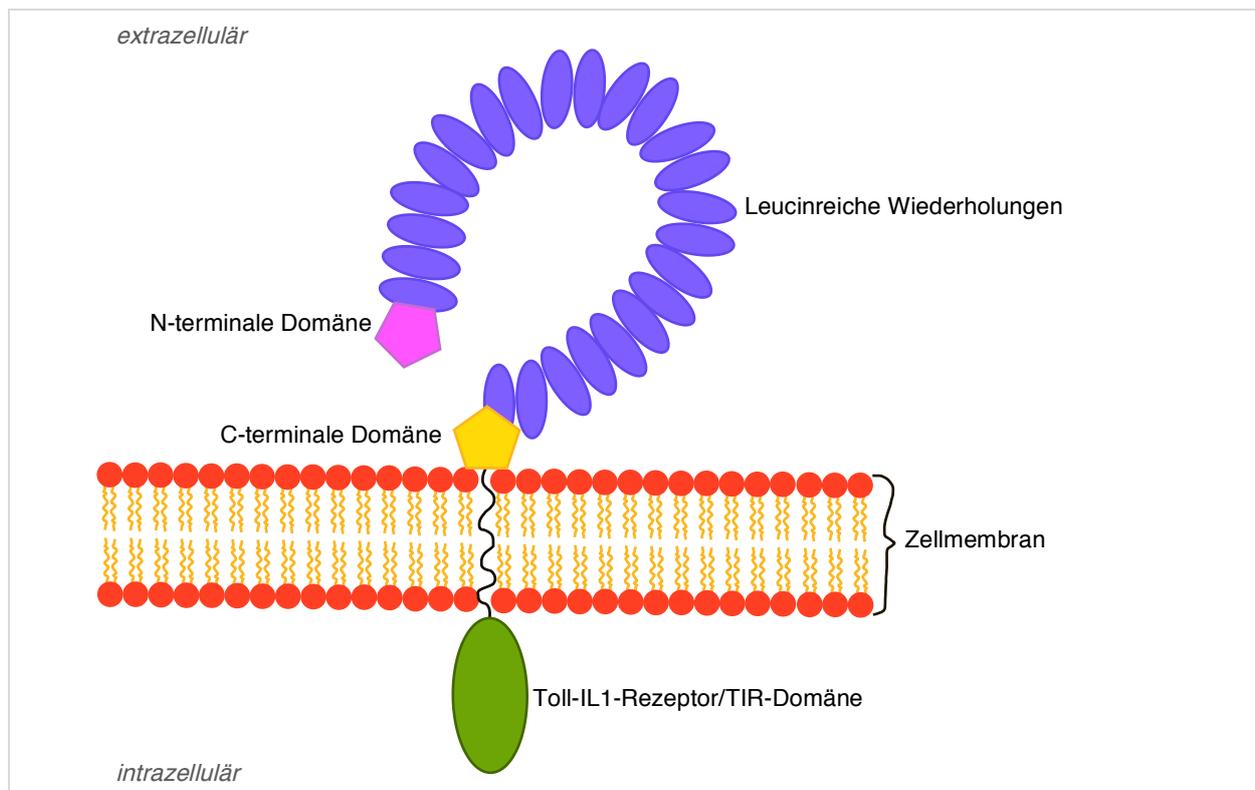


Abbildung 1: Struktur eines Toll-like Rezeptors

Alle TLRs bestehen aus einer extrazellulären-, einer transmembran- und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne wird durch leucinreiche Wiederholungen (LRR) gebildet. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einem Toll-IL1-Rezeptor. Über die intrazelluläre Domäne erfolgt die weitere Signaltransduktion. Die Ligandenbindung erfolgt an der konkaven Seite der hufeisenförmig angeordneten leucinreichen Wiederholungen.

1.2.2.3 TLR – Signalkaskade

Bindet ein TLR ein PAMP, kommt es zur Interaktion zwischen zwei TLRs, indem diese Dimere bilden. Durch die Bildung von Heterodimeren wird ein noch größeres Repertoire an PAMPs erkannt, als durch die Bildung von Homodimeren alleine. Zudem führt die Dimerisation dazu, dass sich die intrazellulären TIR-Domänen einander annähern. Nach der Annäherung der TIR-Domänen findet die Rekrutierung von TIR-Domänen enthaltenden Adaptermolekülen statt (Abbas, Lichtman et al. 2011). Je nach TLR und dem dazugehörigen Adaptermolekül erfolgt die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Es sind vier verschiedene Adaptermoleküle bekannt: MyD88, TIRAP (Mal), TRIF und TRAM. Vereinfacht kann man sagen, dass alle TLR bis auf TLR3, zumindest zum Teil, MyD88 abhängig sind. TLR3 leitet die Signale über das Adaptermolekül TRIF weiter (Akira, Uematsu et al. 2006). TLR4 ist der einzige TLR, der alle vier Adapter benutzt. Am Ende beider Signalkaskaden erfolgt die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren von denen der *nuclear factor κB* (NFκB), das *aktivator Protein 1* (AP-1), der *interferon response factor 3* (IRF3) und der *IRF7* die wichtigsten darstellen. NFκB und AP-1 induzieren weiter die Expression von Genen, die für eine akute inflammatorische Reaktion benötigt werden.

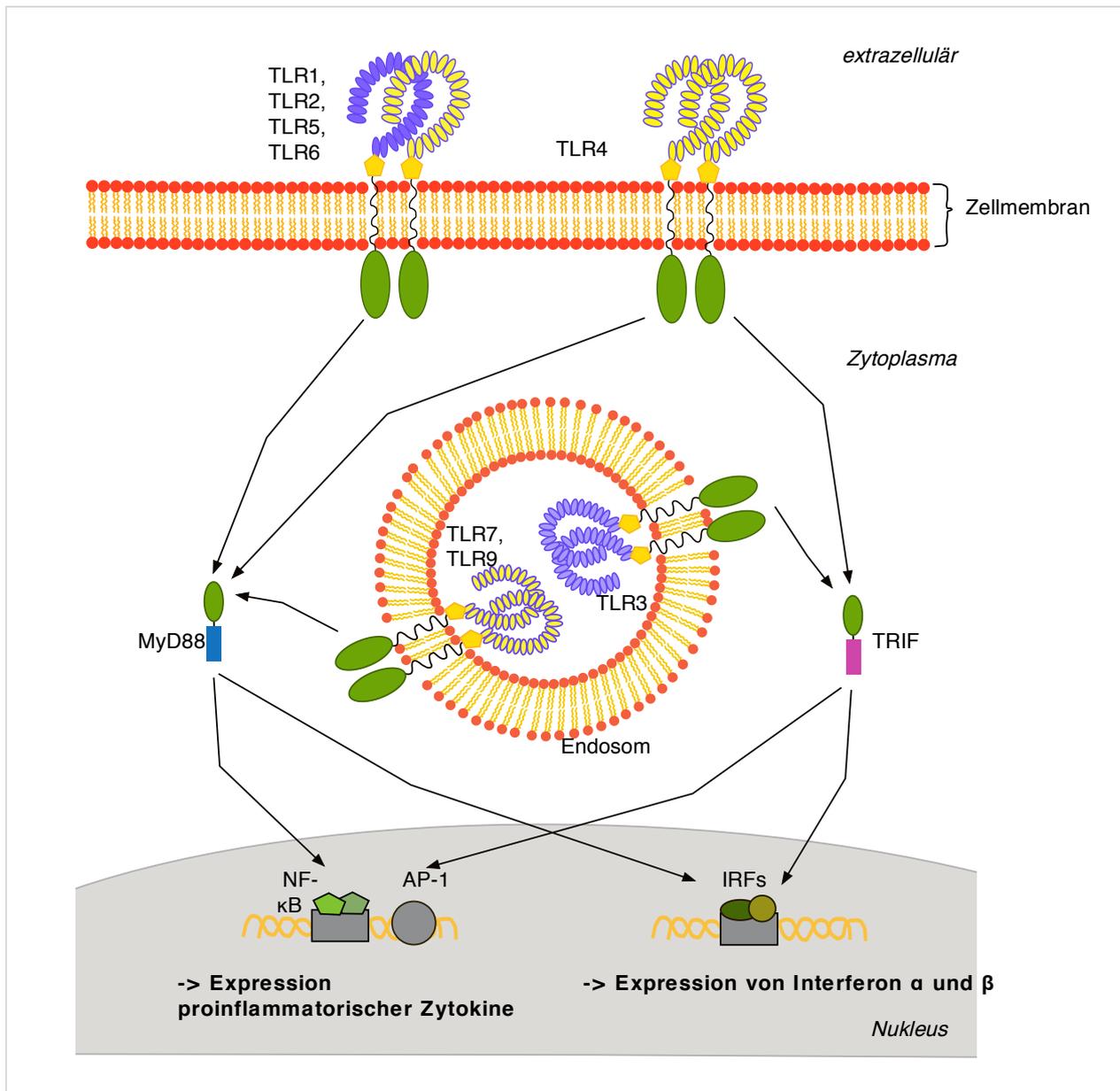


Abbildung 2: Signalweg nach TLR-Aktivierung

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB, AP-1, IRF3 und IRF7 erfolgt sowohl über die MyD88-abhängige Signalkaskade als auch über die TRIF-abhängige Signalkaskade. NFκB und AP-1 induzieren weiter die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. IRF3 und IRF7 induzieren die Sekretion von Interferon α&β, welche eine Rolle bei der antiviralen Immunantwort spielen. Bis auf TLR3 sind alle TLRs zumindest zum Teil MyD88 abhängig.

1.2.3 Toll-like Rezeptoren und Tumoren

TLRs erkennen PAMPs und DAMPs und fördern nach Erkennen dieser durch eine inflammatorische Reaktion, sowie durch die Aktivierung des Immunsystems, die Abwehr von in den Körper eingedrungenen Pathogenen (Hemmi and Akira 2005). In dieser Rolle befinden sich TLRs in der Membran von körpereigenen Immunzellen. Inzwischen wissen wir aber, dass sich TLRs nicht nur in der Membran von Immunzellen, sondern auch in der Membran und in der Umgebung von Krebszellen befinden (Sato, Goto et al. 2009). Die Rolle, die TLRs in der Tumorgenese und Tumorprogression spielen, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Jedoch scheint eine inflammatorische Komponente in der Mikroumgebung eines fast jeden Tumors präsent zu sein (Colotta, Allavena et al. 2009).

DAMPs werden nicht nur von körpereigenen Zellen, sondern auch von gesunden, verletzten oder nekrotischen Tumorzellen sezerniert. Erkennen TLRs diese, werden diverse Signalkaskaden in Gang gesetzt, wodurch es zur Sezernierung von Karzinogenen wie z.B. NF- κ B, NOS2, antiapoptotischen und Angiogenese fördernden Proteinen und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommt. Möglicherweise beeinflusst der chronische Entzündungsreiz die Mikroumgebung des Tumors und fördert so letzten Endes das Überleben des Tumors, sowie seine Progression durch die veränderte Mikroumgebung (Rakoff-Nahoum and Medzhitov 2009, Sato, Goto et al. 2009, Ridnour, Cheng et al. 2013).

Auf der anderen Seite werden TLR-Agonisten auch in der Tumorthherapie eingesetzt. So wurden bereits einige TLR-Agonisten in der klinischen Therapie getestet. Zugelassen und erfolgreich eingesetzt werden derzeit jedoch nur zwei - das Bacillus-Calmette-Guérin (BCG), welches in der Therapie der Harnblasenkarzinoms zugelassen ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2016), sowie der TLR7 Agonist Imiquimod (Guha 2012). Auf den zuletzt genannten wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.2.3.1 TLR7 Agonist Imiquimod und dessen Rolle in der Tumorthherapie

Wie dem vorherigen Abschnitt entnommen werden kann, spielen TLRs eine mögliche Rolle in der Entwicklung und Progression von Tumoren. Damit stellen sie einen interessanten Angriffspunkt für Therapien dar. Ein TLR-Agonist, der als Immuntherapeutikum zugelassen ist, ist Imiquimod. Bei Imiquimod handelt es sich um ein Imidazochinolin-Amin, welches

strukturell Nukleosid-Analoga ähnelt. Die Creme Aldara® enthält 5% Imiquimod und ist in Deutschland zur Therapie von aktinischen Keratosen oberflächlichen Basalzellkarzinomen (BCC) und äußerlichen Feigwarzen, den Condylomata acuminata, im Genital- und Perianalbereich zugelassen (Rote Liste® Service GmbH 2017). Nach den aktuellen Leitlinien zur Therapie von BCCs ist die chirurgische Exzision Mittel der ersten Wahl (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Ständige Kommission Leitlinien 2013). Jedoch auch durch die Applikation von Imiquimod werden bei oberflächlichen BCCs Heilungsraten von über 80% erreicht und so stellt diese Form der Therapie, besonders bei älteren oder nicht operablen Patienten, eine gute Alternative zur operativen Behandlung dar (Marks, Gebauer et al. 2001, Schulze, Cribier et al. 2005). Über einen Zeitraum von 5 Jahren bleibt die Anzahl der Rezidive nach einer Therapie mit Imiquimod sehr gering. Und wenn, dann zeigt sich das fehlende Ansprechen auf die Therapie bereits innerhalb des ersten Jahres nach Behandlungsbeginn (Williams, Bath-Hextall et al. 2017). Auch in der Therapie anderer Tumoren zeigten sich in Mausmodellen tumorsuppressive Effekte, induziert durch Imiquimod. So führte die Applikation von Imiquimod beispielsweise zur Regression von Mammakarzinomen (Lu, Wagner et al. 2010) und zu einer Verringerung des Dysplasigrades oraler Gewebsveränderungen (Gkoulioni, Eleftheriadou et al. 2010). Auch ließ sich das Tumorwachstum von Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms effektiv durch Imiquimod inhibieren und das Tumorwachstum somit stoppen (Ahn, Kwon et al. 2012).

Der exakte molekulare Mechanismus, der hinter der Wirkung von Imiquimod steckt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Bisher wissen wir:

(I) Durch die Bindung von Imiquimod an TLR7 kommt es zur direkten Aktivierung des MyD88 abhängigen Signalweges und somit insbesondere zur Aktivierung von NFκB und in der Folge zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Hemmi, Kaisho et al. 2002). Die sezernierten Zytokine induzieren wiederum eine T_h1-gewichtete, zelluläre Immunantwort, sowie die Umwandlung von dendritischen Zellen zu dendritischen Killerzellen. Die Killerzellen wiederum greifen Tumorzellen an (Drobits, Holcman et al. 2012).

(II) Durch die Applikation von Imiquimod kommt es zur Migration von plasmazytoiden dendritischen Zellen in die Haut, welche als primäre Sensoren von Imiquimod fungieren (Garzorz-Stark, Lauffer et al. 2018). Diese Untergruppe der dendritischen Zellen exprimiert TLR7 auf ihrer Zelloberfläche und produziert das Immunsystem regulierende Zytokine wie

Interleukin-21 (Garzorz-Stark, Lauffer et al. 2018) und Typ I Interferone wie INF- α (Urosevic, Dummer et al. 2005).

(III) Imiquimod wirkt antiangiogenetisch (Li, Li et al. 2005, Majewski, Marczak et al. 2005) und proapoptotisch auf Tumorzellen (Schon, Wienrich et al. 2004, Vidal, Matias-Guiu et al. 2004).

(IV) Der Hedgehog-Signalweg, der für die Tumorgenese von BCCs einen der wichtigsten darstellt (Gailani, Stahle-Backdahl et al. 1996, Aszterbaum, Rothman et al. 1998), wird durch Imiquimod direkt inhibiert (Wolff, Loipetzberger et al. 2013).

(V) Imiquimod wirkt auch TLR7 unabhängig über den Adenosin-2a (Aa2) Rezeptor. Auch über diesen Rezeptor kommt es zur Induktion proinflammatorischer Zytokine (Schon, Schon et al. 2006).

1.3 Imiquimod in der Therapie von Hauterkrankungen

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, ist die topische Applikation von Imiquimod in Deutschland zur Therapie von aktinischen Keratosen, oberflächlichen BCCs und Condylomata acuminata zugelassen (Rote Liste® Service GmbH 2017). Aber auch nach der Off-label Anwendung von Imiquimod in der Therapie anderer Erkrankungen zeigten sich in Einzelfallberichten klinische Erfolge.

Der TLR7 Agonist wird jedoch derzeit verwendet, ohne dass bisher bekannt ist, ob TLR7 als Angriffspunkt von Imiquimod schon in der Haut exprimiert, oder ob die Expression erst durch die topische Applikation induziert wird. Um heraus zu finden, wie die basale TLR7 Expression ist und eventuell ein mögliches Cluster zu erstellen, untersuchten wir eine Auswahl der 24 häufigsten Erkrankungen der Haut auf die Expression von TLR7.

Die Folgende Tabelle (Tabelle 3) gibt einen Überblick über die von uns auf die Expression von TLR7 untersuchten Hauterkrankungen, sowie über eine Auswahl der Therapiemöglichkeiten dieser.

Tabelle 3: Die von uns auf die Expression von TLR7 untersuchten Hauterkrankungen und eine Auswahl der Therapiemöglichkeiten

Diagnose	Definition	Therapie	Quellen
Infektiöse Erkrankungen			
Acrodermatitis chronica atrophicans	Hauterkrankung im Spätstadium einer Infektion mit Borrelien	- Antibiotische Therapie	(Deutsche Gesellschaft für Dermatologie 2016)
Condylomata acuminata	Durch humane Papillomviren (HPV) ausgelöste anogenitale Viruswarzen	- Topisch Imiquimod - Mechanische Verfahren (z.B. Kryotherapie)	(Sauder, Skinner et al. 2003, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2006, Ockenfels 2016)
Verruca vulgaris	Durch HPV ausgelöste Viruswarzen	- Topisch z.B. Imiquimod (Off-label) - Mechanische Verfahren (z.B. Kryotherapie)	(Hengge, Esser et al. 2000, Hanna, Abadi et al. 2016, Ockenfels 2016)
Tinea corporis	Durch Dermatophyten ausgelöste entzündliche Dermatophytose	- Antimykotika topisch - Bei schweren Verläufen systemisch	(Deutsche Dermatologische Gesellschaft / Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft 2008, Altmeyers Enzyklopädie 2017)
Chronisch inflammatorische Erkrankungen			
Ekzem	Entzündung von Epidermis und Dermis als Reaktion auf eine Vielzahl exogener Noxen und endogener Reaktionsfaktoren	- Basistherapie - topisch immunsuppressiv bei Exazerbation (Glukokortikoide) - UV-Lichttherapie	(Dirschka, Hartwig et al. 2011, Altmeyers Enzyklopädie 2017)
Lichen planus	Selbstlimitierende Erkrankung der Haut und Schleimhäute ungeklärter Ätiologie	- Topisch immunsuppressiv (Glukokortikoide) - UV-Lichttherapie	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Neutrophile Dermatosen			
Arzneimittlexanthem	Kutane Reaktion nach Medikamenteneinnahme	- Absetzen des Auslösers - Immunsuppressive systemische Therapie (Glukokortikoide)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Vaskulitis	Entzündliche Veränderung der Blutgefäße unterschiedlicher Genese (Allergie, Infekt,..)	- Systemisch immunsuppressiv (Glukokortikoide)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)

Pyoderma gangraenosum	Nichtinfektiöse Dermatose, unklarer Genese	- Hochdosiert systemisch immunsuppressiv (Glukokortikoide)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Sweet Syndrom	Akute, hoch fiebrige Systemerkrankung, meist infekta allergisch	- Systemisch immunsuppressiv (Glukokortikoide)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Granulomatöse Erkrankungen			
Granuloma anulare	Benigne granulomatöse Erkrankung unklarer Genese	- Hohe Spontanheilungsrate - Lokal immunsuppressiv (Glukokortikoide) - Mechanische Verfahren (z.B. Kryotherapie)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Rosazea	Entzündliche, das Gesicht betreffende, Dermatose des Erwachsenenalters multifaktorieller Genese	- Antibiotische Therapie - Operative Abtragung des Rhinophyms	(Deutsche Dermatologische Gesellschaft 2008)
Sarkoidose	Systemerkrankung, unklare Genese, genetische Prädisposition	- Kutane Sarkoidose: topisch immunsuppressiv (Glukokortikoide)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Bullöse Autoimmunerkrankungen			
Bullöses Pemphigoid	Autoimmunerkrankung mit Bildung von Antikörpern gegen hemidesmosomale Strukturproteine	- Systemisch Immunsuppressiv (z.B. Glukokortikoide, Azathioprin)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Pemphigus vulgaris	Autoimmunerkrankung mit Bildung von Antikörpern gegen desmosomale Proteine	- Systemisch Immunsuppressiv (z.B. Glukokortikoide, Azathioprin)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Kollagenosen			
Morphea	Chronisch entzündliche Bindegewebserkrankung unklarer Ätiologie	- Topisch immunsuppressiv (Glukokortikoide) - Off-label: Imiquimod - UV-Lichttherapie	(Deutsche Dermatologische Gesellschaft 2014)
Lichen sclerosus et atrophicus	Chronisch entzündliche Bindegewebserkrankung der Haut und Schleimhäute	- Topisch immunsuppressiv (Glukokortikoide) - Hormonell bei genitalem Auftreten	(Dirschka, Hartwig et al. 2011, Altmeyers Enzyklopädie 2017)

Lupus erythematoses	Chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung	- UV-Karenz - Topisch oder systemisch immunsuppressiv (z.B. Glukokortikoide) - Antimalariamedikamente (z.B. Chloroquin)	(Deutsche dermatologische Gesellschaft 2008, Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Tumoren			
Aktinische Keratose	Häufigstes in-situ-Karzinom der Haut hellhäutiger Menschen	- Topisch: Imiquimod - mechanische Verfahren (z.B. oberflächliche Abtragung mittels Skalpell) - Lichttherapie (Photodynamische Therapie)	(Deutsche dermatologische Gesellschaft 2011, Dirschka, Hartwig et al. 2011)
Lentigo maligna	Melanoma in situ	- Operativ - Off-label: Imiquimod	(Enzyklopädie Dermatologie 2017, Tio, van der Woude et al. 2017)
Malignes Melanom	Maligner Tumor der pigmentbildenden Zellen	- Operativ - Therapie von kutanen Metastasen: off-label: Imiquimod	(Steinmann, Funk et al. 2000, Bong, Bonnekoh et al. 2002, Dirschka, Hartwig et al. 2011, Florin, Desmedt et al. 2012, Aspod, Tramcourt et al. 2014)
Morbus Bowen	Intraepidermales Carcinoma in situ	- Operativ - Topisch off-label: Imiquimod	(Goorney and Polori 2004, Mandekou-Lefaki, Delli et al. 2005, Dirschka, Hartwig et al. 2011, Kishi, Shimizu et al. 2015, Enzyklopädie Dermatologie 2017)
Mycosis fungoides	Niedrig malignes T-Zell Lymphom der Haut	- Topisch immunsuppressiv (Glukokortikoide) - Off-label: Imiquimod - UV-Lichttherapie - Polychemotherapie (im Tumorstadium)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011, Deutsche Krebsgesellschaft 2017)
Erkrankung der Haare			
Alopecia areata	Potenziell reversibler Haarausfall unklarer Ätiologie	- Topisch oder systemisch antientzündlich (mit Glukokortikoiden) oder leicht reizend (mit Cignolin)	(Dirschka, Hartwig et al. 2011)

1.4 Ziel der Dissertation

TLR7 Agonisten werden zur Therapie diverser Hauterkrankungen eingesetzt, ohne dass derzeit bekannt ist, welche Erkrankungen TLR7 exprimieren. Mittels immunhistochemischer Färbungen untersuchten wir 164 Proben einer Auswahl von 24 der häufigsten Erkrankungen der Haut. Bei diesen handelte es sich um akut infektiöse-, chronisch infektiöse-, granulomatöse- und Autoimmunerkrankungen, Tumoren und Tumorstufen, sowie Kollagenosen. Ziel war es auf der Proteinebene die basale TLR7-Expression in diesen Gewebeproben darzustellen und herauszufinden, ob es möglich ist, einige der Hauterkrankungen aufgrund ihres TLR7-Expressionsmusters zu charakterisieren.

Seit der Entdeckung von TLRs stehen diese im Fokus der Forschung. Die vollständige Funktion und Aufgabe dieser Rezeptoren ist jedoch bis heute noch immer nicht ganz bekannt. So scheinen sie neben der wichtigen Rolle als Bestandteil des angeborenen Immunsystems auch bei der Entstehung von Tumoren von Bedeutung zu sein.

Bisher wissen wir nicht, ob TLRs das Auftreten von Tumoren eher induzieren und die Tumorgenese fördern, oder ob ihre Aufgabe genau das Gegenteil, also ein eher anti-tumorproliferativer Effekt ist. Auf mRNA-Ebene zeigen SCCs eine vielfach erhöhte TLR7 Expression im Vergleich zu BCCs (Muehleisen, Jiang et al. 2012), unser Ziel war es herauszufinden, ob ein ähnliches Ergebnis auch auf der Proteinebene zu finden ist und ob TLR7 als Marker zu Differenzierung von BCCs, SCCs und dem basosquamösen Karzinom (BSC) dienen könnte.

Neben der chirurgischen Exzision ist eine mögliche Therapieoption zu Behandlung von BCCs, unter anderem die topische Therapie mit Imiquimod. Besonders für ältere und/oder nicht operable Patienten stellt diese Art der Therapie eine gute Alternative dar. Vereinfacht gesagt, kommt es nach dem Auftragen der Creme über TLR7 zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems, einer Entzündungsreaktion und in 80% der Fälle zu einer Abheilung des Hauttumors (Schulze, Cribier et al. 2005). Bisher wusste man nicht, ob TLR7 schon in der Haut vorhanden ist, oder ob dessen Expression erst durch das Auftragen des Wirkstoffs induziert wird. Wir machten es uns zur Aufgabe diese Frage zu klären und untersuchten Hautproben von Patienten mit BCCs vor und nach einer Therapie mit Imiquimod auf die Expression von TLR7.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Material für die Gewinnung der Haut Biopsien	
Reagenzien	
Xylonest 1% mit Adrenalin 1:200 000	AstraZeneca (London, United Kingdom)
Octeniderm Antiseptische Lösung	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt)
Paraformalin	Fischar Otto GmbH & Co. KG (Saarbrücken)
Aldara® 5% Creme	Meda Pharma (Solna, Sweden)
Arbeitshilfen und Materialien	
Steriles chirurgisches Set (inklusive Schere und Zangen)	Gewöhnliche chirurgische Instrumente, unterschiedliche Hersteller
Raucodrape 90x75 cm chirurgisches Loch Tuch	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied)
Biopsie Stanze 3mm	Stiefel Laboratorium GmbH (Offenbach am Main)
Biopsie Stanze 2mm	Stiefel Laboratorium GmbH (Offenbach am Main)
Dafilon 4/0 (1,5 metric) Nahtmaterial, REF 0936235	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterican® Einmalkanülen 20G und 30G	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
2 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Material für die Immunhistochemie	
Reagenzien	
Bond™ Wash Solution 10x	Leica Biosystems (Wetzlar)
Bond™ Epitope Retrieval Solution 1 and 2	Leica Biosystems (Wetzlar)
Bond™ Dewax Solution	Leica Biosystems (Wetzlar)
Bond™ Polymer Refine Red Detection Kit	Leica Biosystems (Wetzlar)
Ethanol 70%	Brüggemann (Heilbronn)
Ethanol 80%	Fischar (Saarbrücken)
Ethanol 96%	Fischar (Saarbrücken)
Absoluter Alkohol	Fischar (Saarbrücken)
Xylol	Hedinger (Stuttgart)

Antikörper	
anti TLR7 ab124928 0,648mg/ml	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
Bond primary antibody diluent AR 9352	Leica Biosystems (Wetzlar)
Technische Geräte, Materialien und Software	
Mikroskop Objektträger Superfrost Plus 25x75mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG (Braunschweig)
Eukitt® quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mikroskop Deckglas 24x60 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG (Braunschweig)
Mikrotom RM 2255	Leica Biosystems (Wetzlar)
BOND-MAX Autostainer system	Leica Biosystems (Wetzlar)
Universal Ofen	Memmert (Schwabach)
BX45 widefield microscope. ausgestattet mit 10x/0.25, 20x/0.40 und 40x/0.65 Objektiven, einer SC30 Digitalkamera und cellSens Software	Olympus (Tokio, Japan)
Apple iPad 4 mit Visual Counter Applikation	Apple Inc. (Cupertino, USA)
R Version R 3.3.2 (2016-10-31)	R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, (Wien, Österreich).
Material für die Immunfluoreszenz	
Reagenzien	
Citric acid monohydrate	Merck KGaA (Darmstadt)
Sodium hydroxide solution (NaOH) 1N	Merck KGaA (Darmstadt)
Hydrochloric acid (HCl) 5N	Merck KGaA (Darmstadt)
KCl	Merck KGaA (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA (Darmstadt)
Trizma base	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
EDTA	Merck KGaA (Darmstadt)
Sodium chloride (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tween 20 Detergent	Merck Millipore , Merck KGaA (Darmstadt)
Roticlear®	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Citrate Puffer	Citric acid monohydrate 4.2 g hinzufügen zu 2 l dH ₂ O Anpassen des pH auf 6.0 mit NaOH
EDTA Puffer	0.37 g EDTA hinzufügen zu dH ₂ O 1000 ml Anpassen des pH auf 8.0 mit 1N NaOH
Tris-Puffer 10x	Trizma Base 60.5 g hinzufügen zu 700 ml dH ₂ O anpassen des pH auf 7.6 mit HCl hinzufügen von NaCl 90 g hinzufügen zu 1000 ml dH ₂ O
PBS 10x	Na ₂ HPO ₄ 14.4 g, KH ₂ PO ₄ 2.4 g NaCl 80 g KCl 2g dH ₂ O 1000 ml mischen und anpassen des pH auf 7.4
Sudan Black B	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) 30% solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Vectashield Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Ethanol, isopropanol (denaturiert)	Clinic pharmacy
Antikörper und Seren	
Normal goat serum	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Normal donkey serum	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Anti TLR7 ab124928 0,648mg/ml	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
Mouse anti-CD2	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mouse anti-cytokeratin AE1&AE2	Zytomed Systems
Technische Geräte und Materialien	
InoLab pH 7110 (pH meter)	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim)
Kern 770 (precision balance)	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Schnellkochtopf "Perfect" (4,5 l)	Württembergische Metallwarenfabrik (Geislingen)
Universal Ofen (für die Deparaffinisation)	Memmert (Schwabach)
Rotilab Einweg-Wiegeschalen	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Rührstäbe und Metalllöffel	Diverse Hersteller

Spritzengetriebene Filtereinheit Millex-HV PVDF 0,45mm	Merck Millipore , Merck KGaA (Darmstadt)
Omnifix 20 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG
StainTray slide staining system	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Staining dishes	Diverse manufacturers
PAP PEN MaxTag™ hydrophobic barrier pen	Rockland antibodies & assays (Gilbertsville, USA)
Mikroskop Deckglas 24x60 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG (Braunschweig)
Nagelack, farblos	P2 cosmetics (Karlsruhe)
IX73 Inversmikroskopsystem ausgestattet mit 4x/0.13, 20x/0.45 und 40x/0.60 Objektiven und einer XM10 monochromen, gekühlten CCD Kamera mit cellSens Software	Olympus (Tokio, Japan)
Mikroskop Objektträger Superfrost Plus 25x75mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG (Braunschweig)

2.2 Methoden

1.2.4 2.2.1 Epidemiologische Daten

2.2.1.1 TLR7-Expression in unterschiedlichen Hauterkrankungen

Alle verwendeten, in Paraffin eingebetteten Proben stammen aus dem Archiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München.

Die Gewebeproben wurden zum Zwecke der Routinediagnostik mit dem Einverständnis der jeweiligen Patienten entnommen. Die Proben unterliefen einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und wurden von zwei unabhängigen Histologen begutachtet.

Die durchgeführte Studie umfasst 164 Patienten (90 Männer, 74 Frauen). Das mittlere Alter war 52,7 Jahre (von 7 bis 82 Jahre).

Die Studie umfasste die folgenden Hauterkrankungen:

Diagnose	n	männlich	weiblich
Infektiöse Erkrankungen			
Acrodermatitis chronica atrophicans	4	4	0
Condyloma acuminata	10	9	1
Verruca vulgaris	8	4	4
Tinea	10	8	2
Chronisch inflammatorische Erkrankungen			
Ekzem	10	6	4
Lichen planus	8	2	6
Neutrophile Dermatosen			
Arzneimittlexanthem	7	4	3
Vaskulitis	9	4	5
Pyoderma gangraenosum	9	3	6
Sweet Syndrom	5	2	3

Granulomatöse Erkrankungen			
Granuloma anulare	5	0	5
Rosazea	8	5	3
Sarkoidose	8	6	2
Bullöse Autoimmunerkrankungen			
Bullöses Pemphigoid	1	0	1
Pemphigus vulgaris	3	2	1
Kollagenosen			
Morphea	5	2	3
Lichen sclerosus et atrophicus	4	0	4
Lupus erythematoses	10	5	5
Tumoren			
Aktinische Keratose	8	5	3
Lentigo maligna	7	6	1
Malignes Melanom	7	4	3
Morbus Bowen	5	2	3
Mycosis fungoides	5	3	2
Erkrankungen der Haare			
Alopecia areata	7	4	3
Summe	164	90	74

2.2.1.2 TLR7-Expression in malignen epithelialen Tumoren

Auch hier stammen die verwendeten Gewebeproben aus dem Archiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München.

Die Gewebeproben wurden mit dem Einverständnis der jeweiligen Patienten entnommen und dienten der Diagnosesicherung. Die Proben unterliefen einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und wurden von zwei unabhängigen Histologen begutachtet.

Die Studie umfasste 51 Patienten (32 Männer, 19 Frauen) und das mittlere Alter der Patienten betrug 77 Jahre. Die Studie umfasste 24 spinözelluläre Karzinome (SCC), 23 BCCs und 4 BSCs.

Die SCCs wurden nach der Broders Klassifikation(Schwab 2012) in die drei Subtypen G1= gut differenziert, G2= mäßig differenziert und G3= schlecht differenziert eingeteilt. Die BCC in die Subtypen „superfiziell“ (n=9), „solide“ (N=8) und „sklerodermiform“ (n=6).

2.2.1.3 TLR7-Expression vor und nach einer Therapie mit Imiquimod

Es haben 8 Patienten (6 Männer, 2 Frauen) an der Studie teilgenommen. Sie gaben ihre schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie (Ethiknumer 5060/11), welche vom lokalen Ethikkomitee genehmigt wurde. Insgesamt wurden 16 Proben genommen. Das mittlere Alter der Patienten bei Studieneinschluss betrug 66 Jahre. Die Studie umfasste sechs superfizielle BCCs (zwei davon waren multizentrisch), ein Condyloma acuminatum und eine bowenoide aktinische Keratose.

Nach der ersten Probenentnahme zur Diagnosesicherung trugen die Patienten drei Mal pro Woche für 14-28 Tage eine Creme namens Aldara® auf, welche 50mg Imiquimod pro Gramm enthält. Nach 21 – 83 Tagen wurde eine erneute Stanzbiopsie aus dem gleichen Areal entnommen und histologisch untersucht.

1.2.5 2.2.2 Probenentnahme

Nach einer gründlichen Desinfektion des für die Biopsie vorgesehenen Bereiches der Haut, erfolgte die lokale Anästhesie mit dem lokalen Anästhetikum Xylonest (Prilocain). Im Anschluss daran erfolgte die erneute Desinfektion, das Abdecken des Biopsiebereiches mit einem sterilen Lochtuch und die Entnahme der Probe mit einer im Durchmesser 3-4mm großen Biopsiostanze. Das entnommene Gewebe wurde in 10% Formalin fixiert. Abschließend wurde die Wunde mittels einer Einzelknopfnahnt primär verschlossen, erneut desinfiziert und mit einem Pflaster versorgt.

1.2.6 2.2.3 Immunhistochemie

Um die Proben immunhistochemisch zu färben, wurden die in Formalin fixierten Proben in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 3µm dicke Schnitte aller Proben erzeugt. Um eine optimale Haftung des Gewebes am Glasobjektträger zu gewährleisten, wurden die Schnitte vor der immunhistochemischen Färbung für 25 Minuten auf 65 °C erwärmt. Die weiteren Vorbereitungen (das Entparaffinisieren und das Rehydrieren) und auch die Färbungen selbst wurden von einem automatisierten BOND System nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach der Rehydration und der Antigendemaskierung in einer Citrat-Puffer epitope retrieval Lösung (pH 6) (Leica), erfolgte die Inkubation der Schnitte mit einem monoklonalen Antikörper gegen TLR7, gefolgt von der Applikation eines sekundären polymeren, alkalische Phosphatase gekoppelten anti-rabbit-Antikörpers. Der Komplex wurde durch das Substrat Chromogen Fast Red sichtbar gemacht und mit Haematoxylin gegengefärbt.

Die Dehydration erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, Ethanol 80%, Ethanol 96 %, abs. Alkohol, Xylol). Abschließend wurden die Schnitte nach der Applikation eines Tropfens Eukitt® quick-hardening mounting medium mit einem Deckglas luftdicht eingedeckt.

Für die Auswertung wurden die Bereiche der stärksten Infiltrate mit einem Inversmikroskopsystem von Olympus bei 200facher Vergrößerung mit Hilfe der Software CellSens aufgenommen. Sowohl die positiven als auch die Zellen des gesamten Infiltrates wurden mit der Softwareapplikation Visual Counter auf einem Tablet (Apple iPad) ausgezählt. Hierbei wurde jede einzelne Zelle nach dem Antippen markiert und von der Software erfolgte eine fortlaufende Zählung. Eine genaue Zählung der Zellen konnte so auch bei einer großen Zellanzahl gewährleistet werden. Bei inhomogenen Infiltraten erfolgte die Auszählung der Zellen zweier visueller Felder.

1.2.7 2.2.4 Immunfluoreszenz

Die zuvor mit dem Mikrotom geschnittenen, 3µm dicken, in Paraffin eingelegten Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht, 25 Minuten auf 65 °C in einem Ofen erwärmt und

anschließend über eine Alkoholreihe rehydriert. Die Demarkierung der Antigene erfolgte durch das sieben Minuten lange Kochen der Schnitte in einem mit Citrat-Puffer (pH 6) gefüllten Hochdruckkochtopf. Anschließend wurden die Schnitte drei mal für zwei bis drei Minuten mit Tris-Puffer gespült, im nächsten Schritt mit Peroxidase 3% für 15 Minuten geblockt und erneut drei mal für zwei bis drei Minuten mit Tris-Puffer gespült.

Um unspezifische Färbungen zwischen den primären Antikörpern und dem Gewebe zu blockieren, wurden im nächsten Schritt die Schnitte eine Stunde mit einem Antikörperdiluent, welches aus 10% normalem Ziegenserum und 10% normalem Eselserum bestand, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit abgeschüttet und die primären Antikörper: anti-TLR7, sowie anti-CD2 und anti-Zytokeratin AE1 und AE2, gelöst in Antikörperdiluent, appliziert, eine Stunde bei Raumtemperatur und dann über Nacht im Kühlschrank gelagert. Im Anschluss wurde drei Mal für zwei bis drei Minuten mit Tris-Puffer gespült. Schließlich wurden die sekundären Antikörper: Ziegen-anti-Hase-Antikörper (Life Technologies) und Esel-anti-Maus-Antikörper (R&D Systems) appliziert. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit Tris-Puffer 3 Mal für zwei bis drei Minuten gespült und im Anschluss 20 Minuten in Sudan Black B 0,1% getaucht. Nach zwei bis drei Minuten Lufttrocknung fand eine Waschung mit Tween 20 gelöst in PBS 0,02% und anschließend die zweimalige Spülung mit destilliertem Wasser für fünf Minuten statt. Als letztes wurde auf jeden Schnitt für zwei bis fünf Minuten eine DAPI Lösung 1:1000 gegeben und ein letztes Mal für fünf Minuten mit Tris-Puffer gespült. Die Schnitte wurden mit VectaShield und einem Mikroskop-Deckglas abgedeckt, welches mit farblosem Nagellack umrandet wurde. Im Anschluss wurden Bilder im blauen (DAPI), roten (CD2, Zytokeratin AE1&AE3, jeweils) und grünen (TLR7) Kanal eines Olympus IX73 Inversions-Fluoreszenzmikroskop gemacht. Die histopathologische Diagnose erfolgte durch zwei unabhängige Histopathologen. Diese teilten die SCCs nach der Broders Klassifikation (Schwab 2012) in die drei Subtypen G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert und G3 = schlecht differenziert ein. Die BCCs wurden in die vier Subtypen „superfiziell“ (n=9), „solide“ (N=8) und „sklerodermiform“ (n=6) eingeteilt. Nach der Klassifikation von Weedon (Weedon 2002) erfolgte die Diagnose BSC, wenn der Tumor histologische Kriterien sowohl von BCCs als auch SCCs zeigte. Im Kontrast zum reinen BCC zeigen die basaloiden Zellen des BSC ein eosinophiles Zytoplasma, oft fehlt die charakteristische Palisadenstellung und es zeigt sich eine variable zytoplasmatische Keratinisierung.

2.2.5 Statistische Auswertung der histologischen Attribute

Die Histologischen Attribute der Proben vor und nach einer Therapie mit Imiquimod wurden aus den dermatohistopathologischen Berichten in eine Übersichtstabelle (Microsoft® Excel® 2011) eingegeben. Bei den Attributen handelte es sich um vorhanden/nicht vorhanden sein von: Hyperplasie der Epidermis, Hyperkeratose, Akanthose, Parakeratose, Orthokeratose, Hypogranulose, Hypergranulose, Serum Kruste, Spongiose, Interface Dermatitis, Vaskulitis, dilatierte dermale Kapillaren, Mikroabszesse, Infiltrat/Entzündung, Nekrose, Apoptose, Lymphozyten, Epidermotrophismus von Lymphozyten, Neutrophile Zellen, Eosinophile Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Plasmazellen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software R. Um mögliche Korrelationen zwischen der TLR7-Expression und bestimmten histologischen Attributen zu finden wurde der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt, da die Expression von TLR7 nicht normal verteilt war.

3. Ergebnisse

3.1 Das TLR7-Expressionsmuster in den untersuchten Hauterkrankungen ist heterogen

Wir stellten in einer Auswahl der häufigsten Hauterkrankungen die TLR7-Expression auf der Proteinebene dar, um herauszufinden, ob es anhand dieses „Fingerabdruckes“ möglich ist, ein Cluster zur Einteilung der unterschiedlichen Erkrankungen zu erstellen.

Die relative und absolute Zahl der positiv auf TLR7 gefärbten Schnitte war jedoch sehr heterogen in den unterschiedlichen Hauterkrankungen und ein TLR7 „Fingerabdruck“, anhand dessen man die Erkrankungen histologisch klassifizieren könnte, ließ sich nicht finden.

Tabelle 4 zeigt die relative Anzahl der positiv auf TLR7 gefärbten Gewebeproben ohne Bezug auf die Stärke der Anfärbbarkeit (Zahl der TLR7 positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen) zu nehmen. Nur wenige Erkrankungen zeigten in 100% der Fälle eine Expression des Rezeptors. Was jedoch auffällt, ist dass besonders die Erkrankungen aktinische Keratose, Lentigo maligna und malignes Melanom, die zur Gruppe der Tumoren gehören, zu 86-100% TLR7-positiv waren. Auch andere, von uns untersuchten Gewebeproben, zeigten hohe TLR7 Anfärbbarkeiten. So waren 100% der Lichen Planus Proben, 88% der Sarkoidose Proben und 86% der Alopezia Areata Proben TLR7-positiv.

Tabelle 4: Absolute und relative Zahl der TLR7+ Gewebeproben

Diagnose	n	TLR7+ Schnitte	% TLR7+ Schnitte
Infektiöse Erkrankungen			
Acrodermatitis chronica atrophicans	4	2	50%
Condyloma acuminatum	10	0	0%
Verruca vulgaris	8	1	12,5%
Tinea	10	2	20%
Chronisch inflammatorische Erkrankungen			
Ekzem	10	1	10%
Lichen planus	8	8	100%
Neutrophile Dermatosen			
Arzneimittlexanthem	7	4	57%
Vaskulitis	9	5	56%
Pyoderma gangraenosum	9	5	56%
Sweet Syndrom	5	3	60%
Granulomatöse Erkrankungen			
Granuloma anulare	5	3	60%
Rosazea	8	4	50%
Sarkoidose	8	7	88%
Bullöse Autoimmunerkrankungen			
Bullöses Pemphigoid	1	0	0%
Pemphigus vulgaris	3	2	67%
Kollagenosen			
Morphea	5	3	60%
Lichen sclerosus et atrophicus	4	2	50%
Lupus erythematoses	10	4	40%
Tumoren			
Aktinische Keratose	8	8	100%
Lentigo maligna	7	7	100%

Malignes Melanom	7	6	86%
Morbus Bowen	5	2	40%
Mycosis fungoides	5	1	20%
Unklare Genese			
Alopecia areata	7	6	86%
Summe	163		

Bei genauerer Betrachtung der Anzahl der TLR7-positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen des Infiltrats zeigten sich jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede. Abbildung 3 zeigt die unterschiedlichen *relativen* TLR7 Expressionsmuster in den Erkrankungen, deren Proben zu 86-100% TLR7-positiv waren.

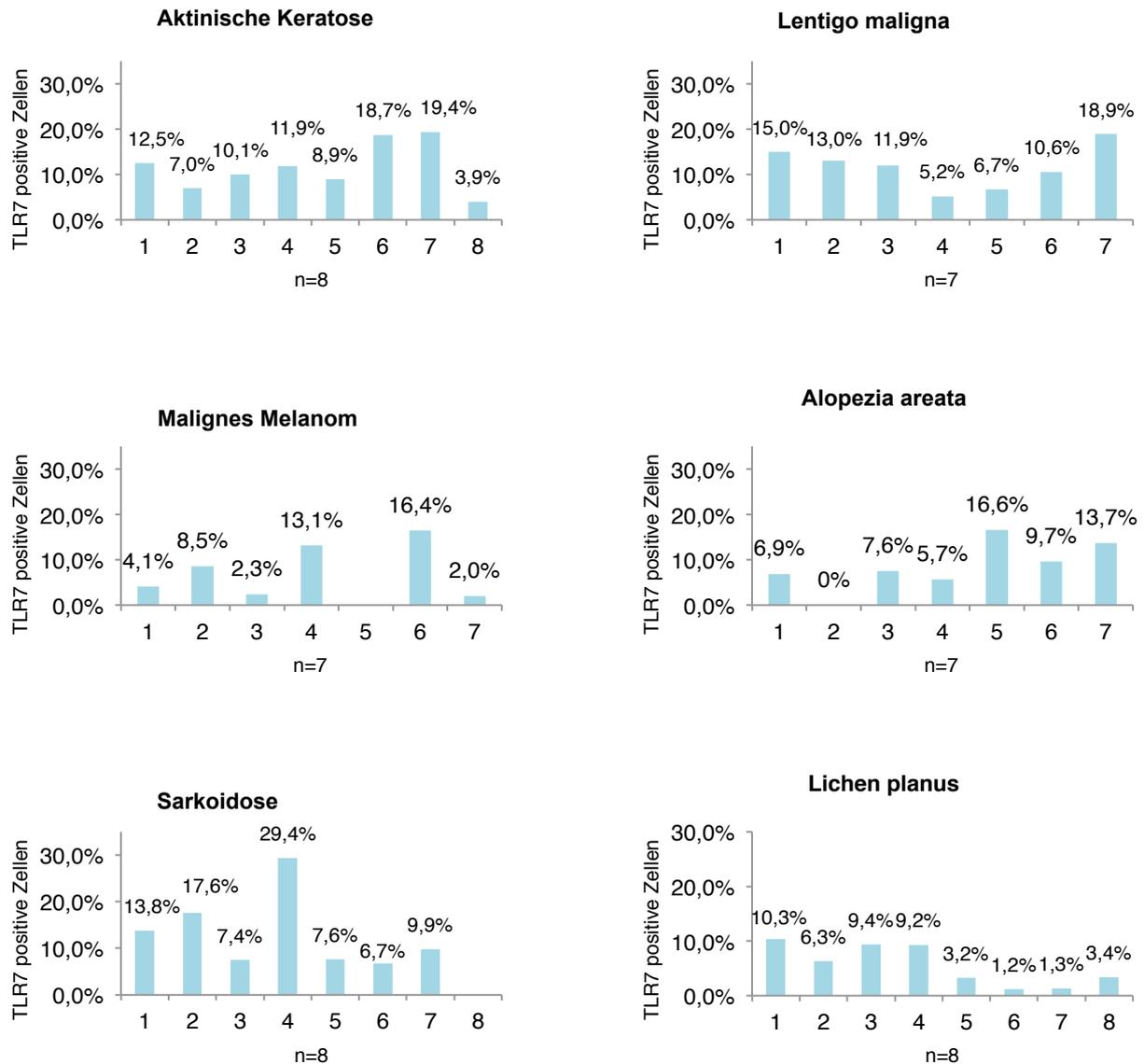


Abbildung 3: TLR7-Expression in den Proben der aktinischen Keratose, der Lentigo maligna, des malignen Melanoms, der Alopecia areata, der Sarkoidose und des Lichen planus.

Jeder Balken repräsentiert die Probe eines anderen Patienten.

Noch größere Unterschiede in der relativen Zahl der TLR7-positiven Zellen fanden wir in den Erkrankungsentitäten, bei denen nur einige Proben positiv auf TLR7 anfärbbar waren. So zeigten beispielsweise die neutrophilen Dermatosen Pyoderma gangraenosum und die Vaskulitis die höchsten relativen Werte für TLR7 (Vaskulitis Probe 9: 35,1%), gleichzeitig waren aber auch nur 56% der Proben insgesamt TLR7-positiv.

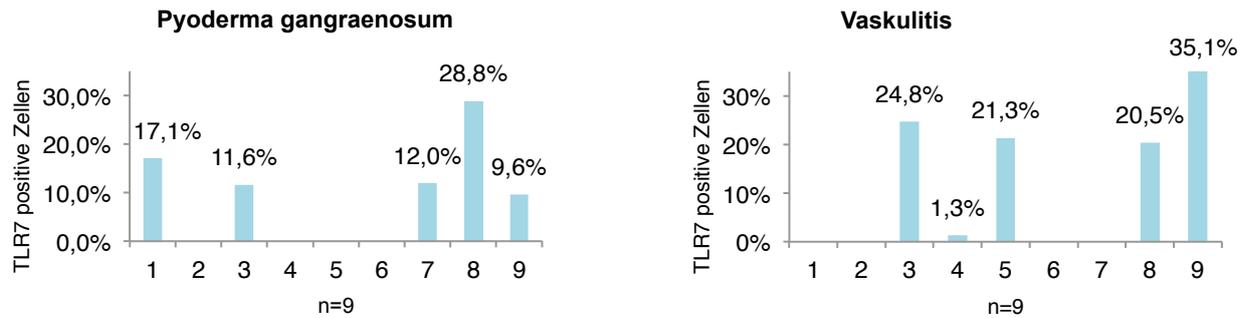


Abbildung 4: TLR-7-Expression in den Proben der neutrophilen Dermatosen Pyoderma gangraenosum und Vaskulitis

Jeder Balken repräsentiert die Probe eines anderen Patienten.

Die infektiösen durch Bakterien, Pilze oder Viren induzierten Erkrankungen ließen sich am wenigsten häufig TLR7-positiv anfärben. In der Gruppe der Tinea corporis (n=10) waren nur 20% positiv anfärbbar und nur zwei von vier (50%) Gewebeproben der Acrodermatitis chronica atrophicans (n=4). Die Expressionsintensität der Acrodermatitis chronica atrophicans unterschied sich stark. So zeigte eine der Proben 32,2% TLR7-positiv Zellen, die andere nur 1,3%. Die beiden durch Viren induzierten Erkrankungen Condyloma acuminatum (n=10) und Verruca vulgaris (n=8) zeigten die wenigste TLR7 Expression. In der Gruppe der Verrucae vulgaris zeigte sich eine Probe TLR7-positiv (12,5%). Die untersuchten Proben der Condylomata acuminata waren komplett TLR7-negativ.

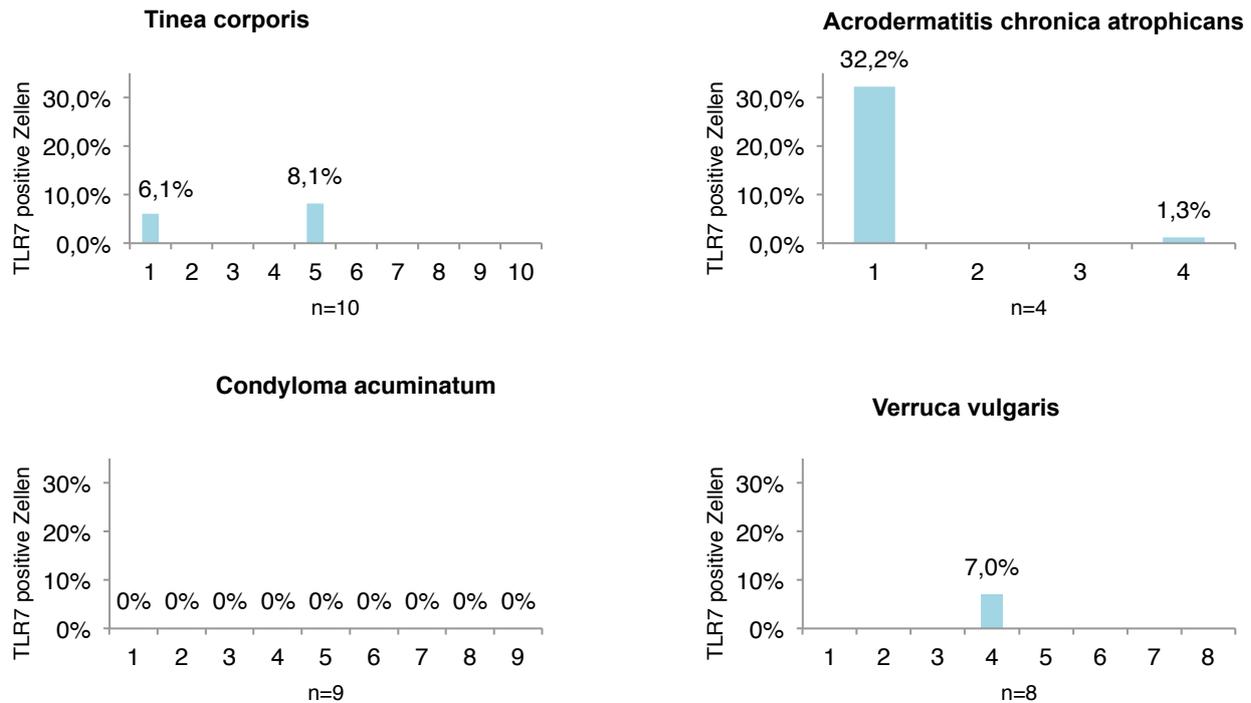


Abbildung 5: TLR7-Expression in den Proben der infektiösen Hauterkrankungen Tinea corporis, Acrodermatitis chronica atrophicans, Condyloma acuminata und Verruca vulgaris.

Jeder Balken repräsentiert die Probe eines anderen Patienten.

3.2 TLR7-Expression in malignen epithelialen Tumoren

Die Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in dem Artikel „Toll-Like Receptor 7 Staining in Malignant Epithelial Tumors“ (Franz, Ritter et al. 2017) veröffentlicht.

3.2.1 TLR7 dient nicht als Marker zur Differenzierung von BCC, SCC und BSC

Die Differenzierung der malignen, epithelialen Tumoren BCC, SCC und BSC ist im klinischen Alltag oft schwierig. Es fehlt besonders an einer spezifischen Klinik, sowie Histopathomorphologie, um das BSC von den beiden anderen Tumoren zu unterscheiden (Garcia, Poletti et al. 2009). Eine Unterscheidung ist jedoch wichtig, da das BSC, sowie das SCC, im Vergleich zum BCC zu einem invasiveren Wachstum und einer höheren Rezidiv- und Metastasenrate neigt (Wermker, Roknic et al. 2015). Somit ist die richtige Diagnose zur Wahl

der richtigen Therapie besonders wichtig. Um herauszufinden, ob es möglich ist, die genannten Hauterkrankungen mittels TLR7 als Marker zu differenzieren, untersuchten wir die immunhistochemische TLR7-Expression von BCC, SCC und BSC.

Tabelle 5: TLR7 Expression in BSCs, BCCs und SCCs

(SCC-Subtypen: ¹=G1, ²=G2, ³=G3 (Broders Klassifikation); BCC-Subtypen: ¹=superfiziell, ²=sklerodermiform, ³=solide)

TLR7-Expression in BSCs, BCCs und SCCs				
Diagnose	n	Tumor-Zentrum	Tumorrand	Peritumorales Infiltrat
BSC	1	+	-	+++
BSC	2	-	-	++
BSC	1	-	-	-
BCC ¹	1	+	+	+++
BCC ²	1	-	+	-
BCC ²	1	-	+	++
BCC ³	1	-	-	+
BCC ³	1	-	-	+++
BCC ²	1	-	-	++
BCC ¹	1	-	-	+
BCC ¹	7	-	-	-
BCC ²	3	-	-	-
BCC ³	6	-	-	-
SCC ¹	1	+++	++	+++
SCC ¹	1	++	+	+++
SCC ¹	1	++	++	++
SCC ¹	1	++	+++	++
SCC ¹	1	-	+	+

SCC ¹	1	-	+	++
SCC ¹	4	-	-	++
SCC ¹	1	-	-	+
SCC ²	1	-	-	+
SCC ¹	4	-	-	-
SCC ²	4	-	-	-
SCC ³	4	-	-	-

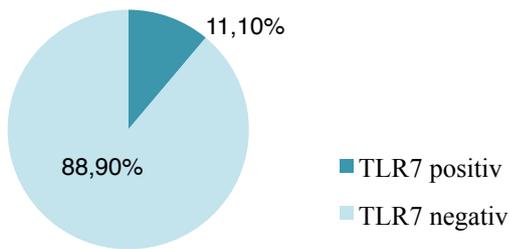
In der Gruppe der BCC (n=4) fanden wir eine Probe, die im Zentrum des Tumors schwach und im peritumoralen Infiltrat stark positiv für die Expression des TLR7 war. Zwei Proben zeigten eine peritumorale Reaktivität und eine Probe war komplett negativ für TLR7 in allen Bereichen. Sieben von 23 BCC (30,4%) zeigten eine variable Intensität der TLR7 Expression im peritumoralen und im Bereich der Adnexen (Schweißdrüsen, perifollikulär). Drei von diesen sieben Proben zeigten zudem eine schwache TLR7 Reaktivität der Immunzellen im Bereich des Tumorzentrums und/oder des Tumorrandes. 16 von 23 BCCs (69,6%) waren TLR7-negativ. Die Analyse der unterschiedlichen Subtypen der BCCs (superfiziell, solide und sklerodermiform) zeigte keine Unterschiede in der Expression von TLR7.

In der Gruppe der SCC waren 45,8% der SCC (n=24) TLR7-positiv.

3.2.2 Eine erhöhte TLR7-Expression in SCCs korreliert mit einem höheren Grad der Differenzierung

Als wir die gefärbten SCCs genauer betrachteten zeigte sich, dass die Stärke der TLR7 Expression mit dem Grad der Differenzierung des Tumors korrelierte. Unter den gut differenzierten SCCs (G1) waren 11 von 15 (73,33%) der Proben entweder im Tumorzentrum oder peritumoral stark TLR7-positiv. Im Gegensatz zu den gut differenzierten SCCs zeigte sich bei den schlechter differenzierten (G2-G3) -bis auf bei einer Probe (11,1%)- keine TLR7 Expression im Bereich des Tumors oder des peritumoralen Infiltrates.

SCC - niedriger differenziert (G2-G3)



SCC- hoch differenziert (G1)

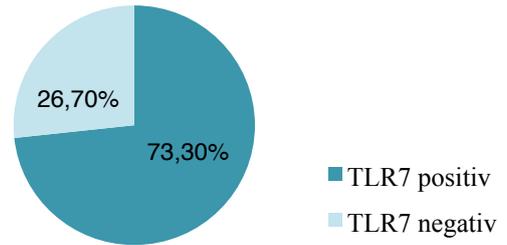


Abbildung 6: TLR7 Anfärbarkeit von hoch differenzierten SCCs im Vergleich zu niedriger differenzierten SCCs.

Hoch differenzierte SCCs zeigten eine positive TLR7 Anfärbarkeit von 73.3%, von den niedrig differenzierten SCCs waren 11,1% der Proben TLR7-positiv.

3.2.3 SCC-Tumorzellen und CD2-positive Zellen zeigen keine TLR7-Expression

Um weitere Einsichten bezüglich der TLR7 Expression innerhalb des Tumors und des tumoralen Infiltrates zu bekommen, führten wir immunfluoreszenz Doppelfärbungen mit CD2, (=Marker für T- und NK-Zellen), AE1/AE2 (=epitheliale Marker für das Zytokeratin in Plattenepithelkarzinomen) und TLR7 durch. Wir fanden heraus, dass TLR7 ausschließlich von den Immunzellen im peri- und/oder im tumoralen Infiltrat und nicht vom Tumor selbst exprimiert wird. Zusätzlich zeigte sich, dass die TLR7-positiven Immunzellen des peritumoralen Infiltrates in enger Interaktion mit den CD2-positiven Zellen standen, welche selbst keine Expression von TLR7 aufwiesen.

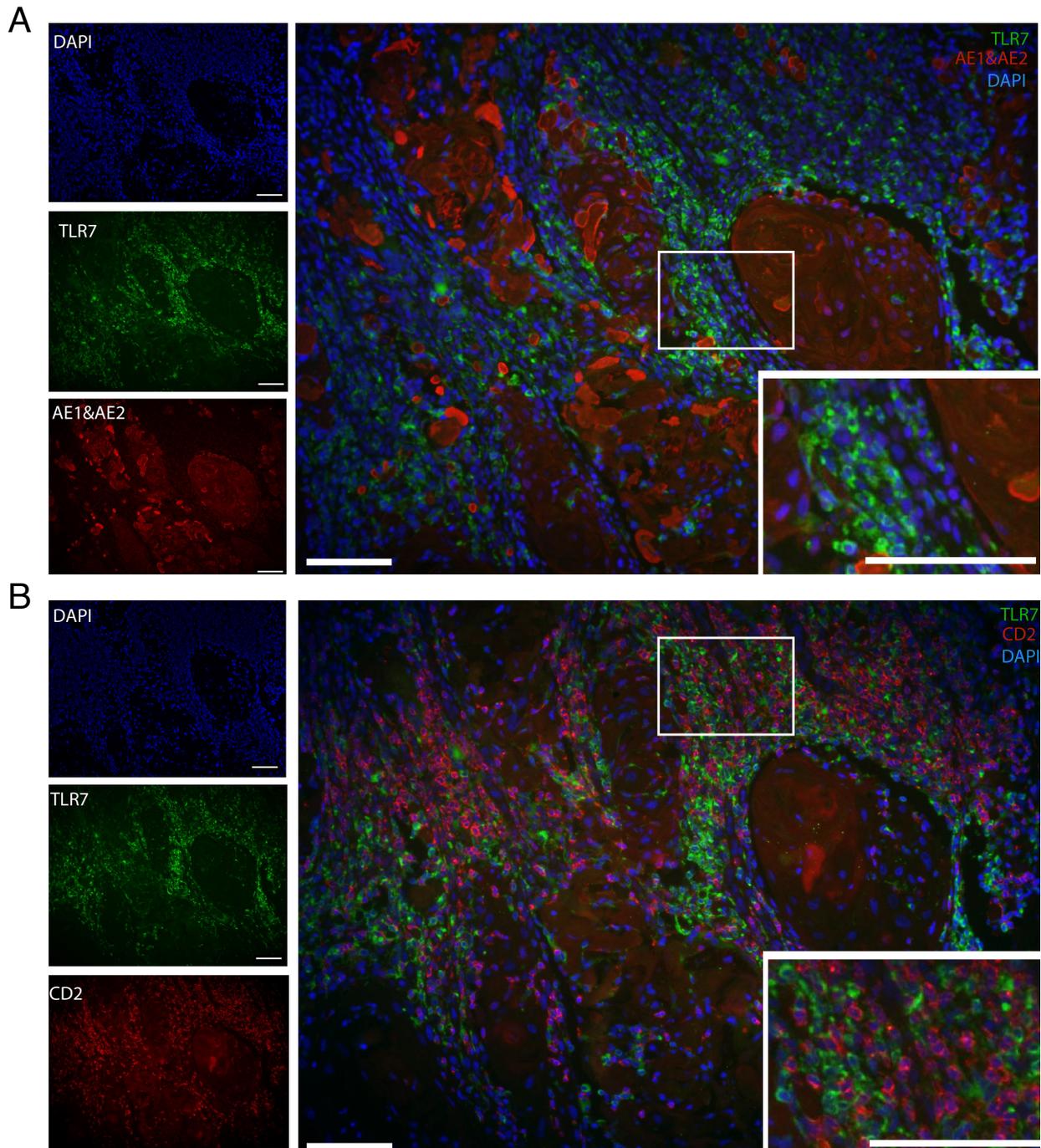


Abbildung 7: Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von TLR7, AE1&AE2, DAPI und CD2
 (A) Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von TLR7 (grün), AE1&AE2 (rot) und DAPI (blau). AE1&AE2 als Marker für Zytokeratin in SCCs, DAPI markiert die DNA der Zellkerne.
 (B) Immunfluoreszenzdoppelfärbungen von TLR7 (grün), CD2 (rot) und DAPI (blau). CD2 als Marker für T- und NK-Zellen, die Hauptakteure in der Mikroumgebung des Tumors.
 Maßstabskala: 100 µm

3.3 Die TLR7-Expression steigt nach einer topischen Therapie mit Imiquimod

Ziel dieser Studie war es die TLR7-Expression in Gewebeproben, vor und nach einer topischen Therapie mit Imiquimod darzustellen. Wir wollten herausfinden, wie hoch die Basalexpression des Rezeptors in den untersuchten Geweben vor der Behandlung ist und wie sich der Anteil an positiven Zellen während einer topischen Therapie mit dem entsprechenden Agonisten verhält.

Es wurden insgesamt 16 Gewebeproben immunhistochemisch auf TLR7 vor und nach einer Therapie mit Imiquimod angefärbt. Bei sechs Patienten wurde die klinische und auch histologische Diagnose BCC gestellt, ein Patient hatte ein Condyloma acuminatum und einer eine bowenoide aktinische Keratose.

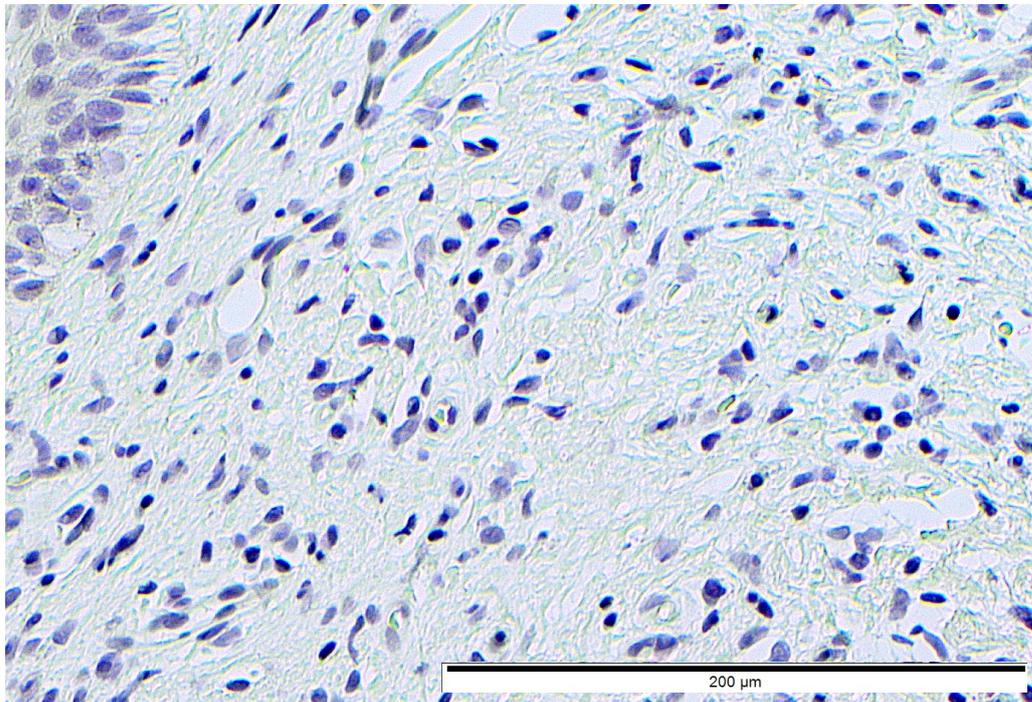
Von sechs untersuchten BCCs zeigten fünf einen deutlichen Anstieg der TLR7 Expression (6,5%-24,2% mehr TLR7-Expression nach der Therapie). Nur bei einem Patienten sank der prozentuale Anteil der TLR7-positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen (-20,9% TLR7-Expression nach der Therapie). Alle Patienten, bis auf einen (Patient 1), waren bei der zweiten Probenentnahme klinisch und histologisch tumorfrei. Histologisch zeigten sich zum Teil sehr starke Entzündungsreaktionen unter der Therapie mit Imiquimod. Alle Patienten (bis auf Patient 2) stellten sich in den nachfolgenden Monaten erneut in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München vor. Es zeigte sich bei keinem der untersuchten Patienten ein Rezidiv des BCCs im behandelten Bereich.

Auch die Proben des Patienten mit der bowenoiden aktinischen Keratose zeigten einen Anstieg der TLR7 Expression (um 3,6%). Die histologische Diagnose nach der zweiwöchigen Therapie ergab jedoch, trotz einer stattfindenden inflammatorischen Reaktion, erneut das Bild einer bowenoiden aktinischen Keratose.

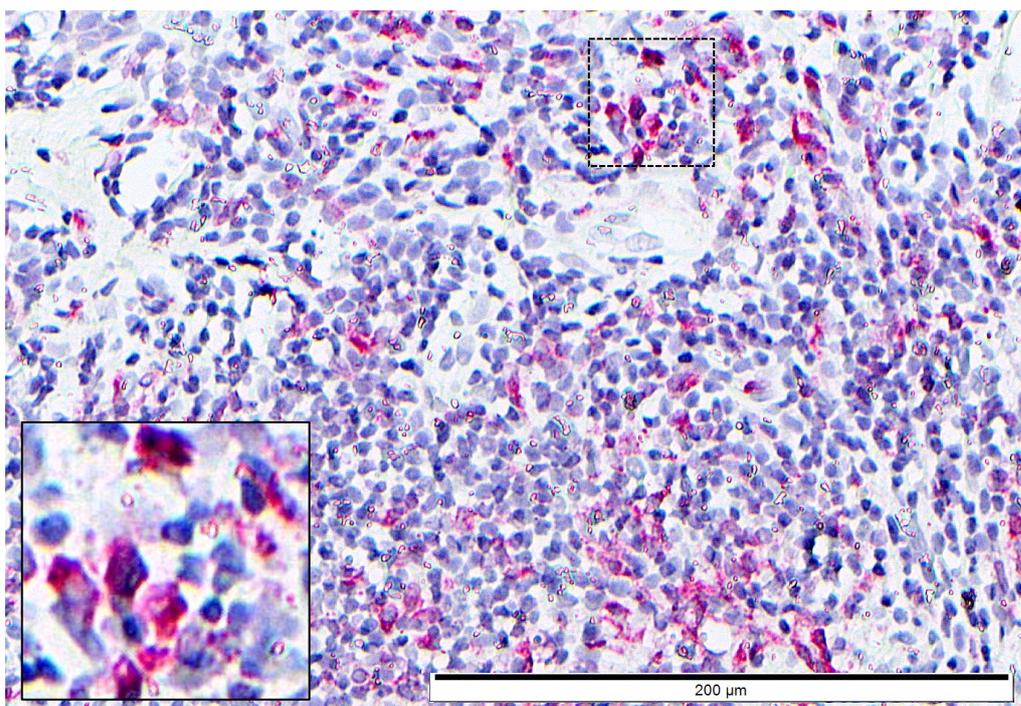
Die Proben des Patienten mit Condyloma acuminatum zeigten weder vor noch nach der Therapie eine TLR7-Expression. Zudem zeigte sich kein Therapieerfolg.

TLR7-Expression in der Haut vor und nach der topischen Therapie mit Imiquimod

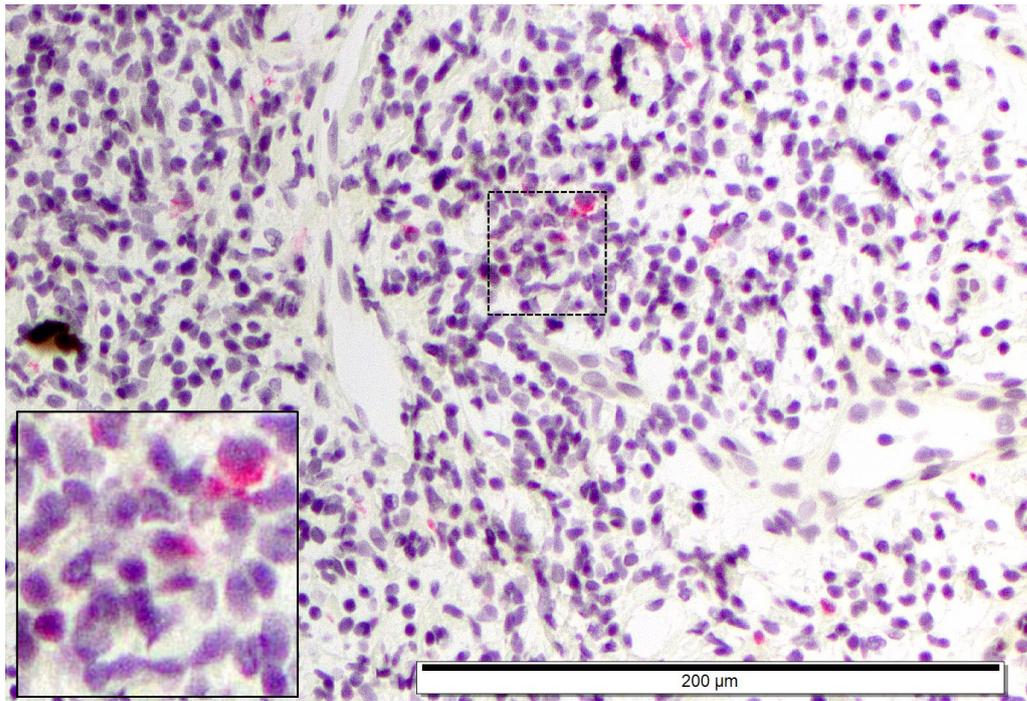
Basalzellkarzinom



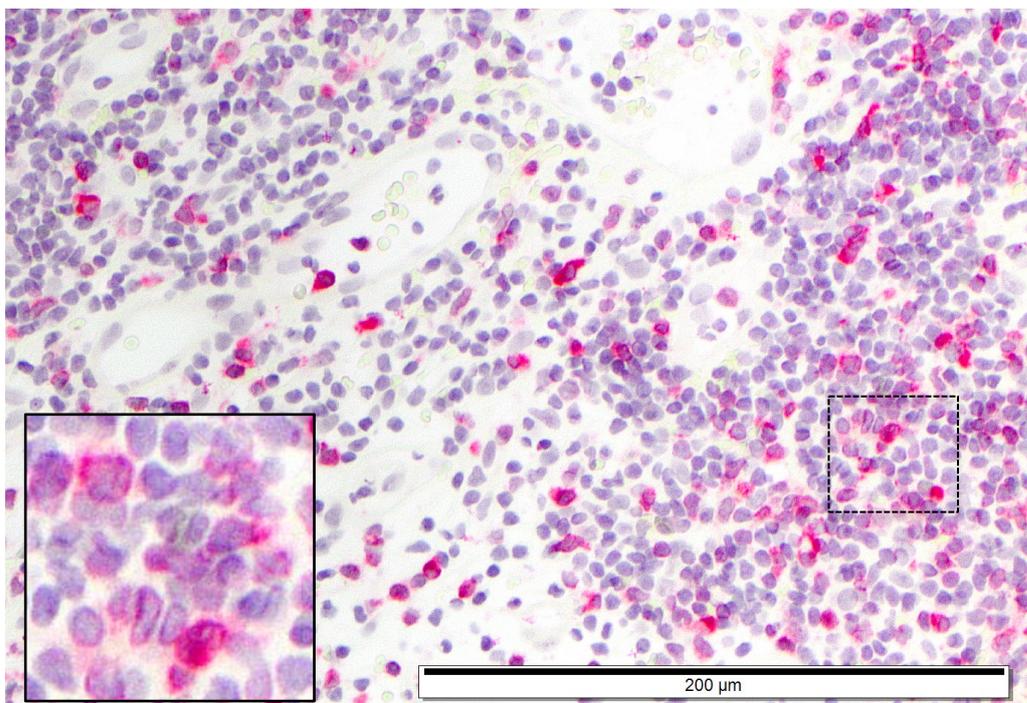
Patient 2 vor der Therapie mit Imiquimod: 0% TLR7+ Zellen



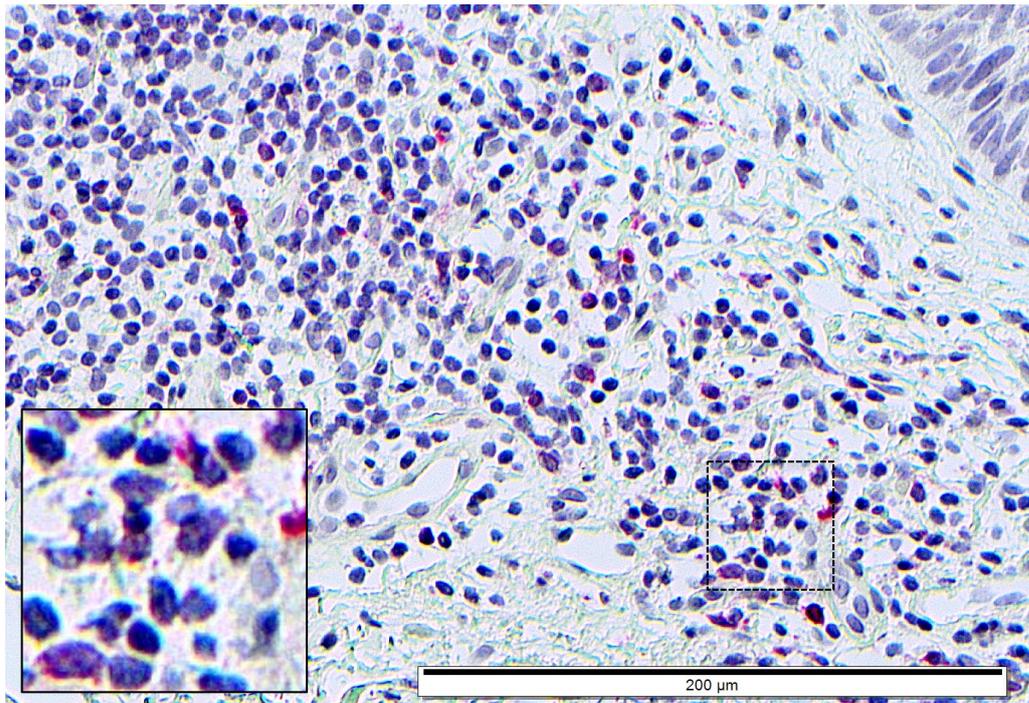
Patient 2 nach der Therapie mit Imiquimod: 7,2% TLR7+ Zellen



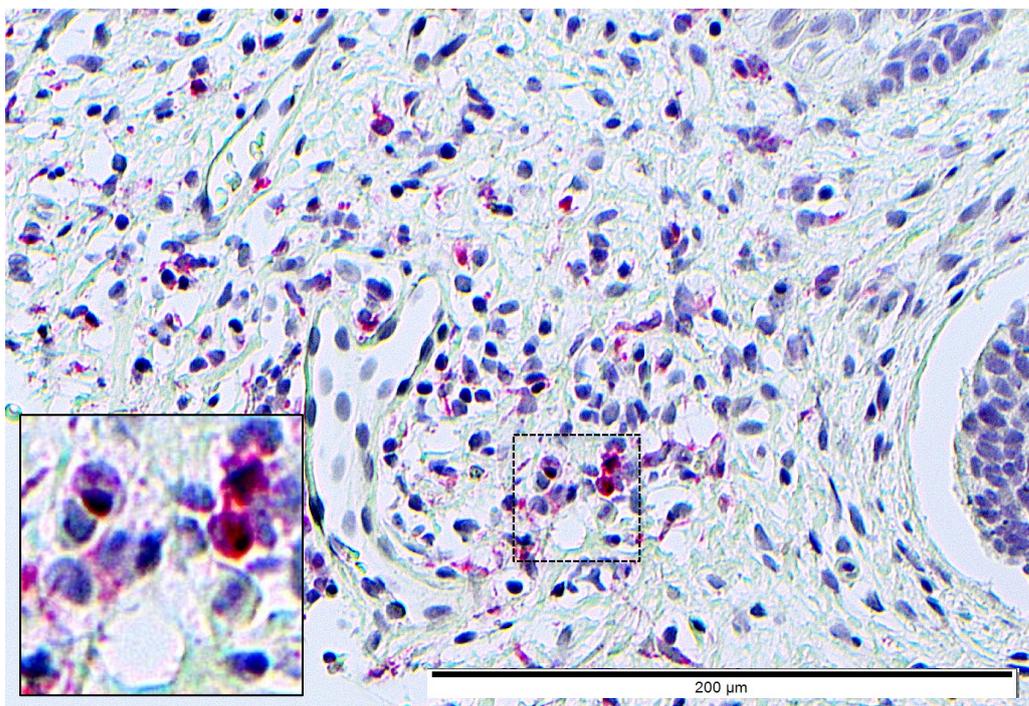
Patient 3 vor der Therapie mit Imiquimod: 1,7% TLR7+ Zellen



Patient 3 nach der Therapie mit Imiquimod: 25,9% TLR7+ Zellen

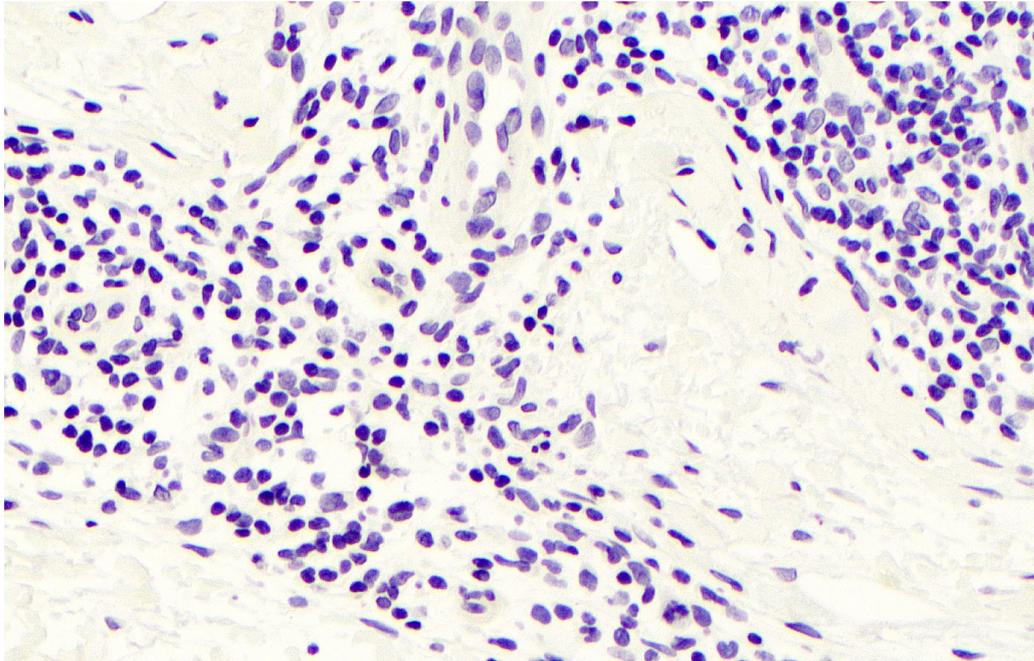


Patient 4 vor der Therapie mit Imiquimod: 3,6% TLR7+ Zellen

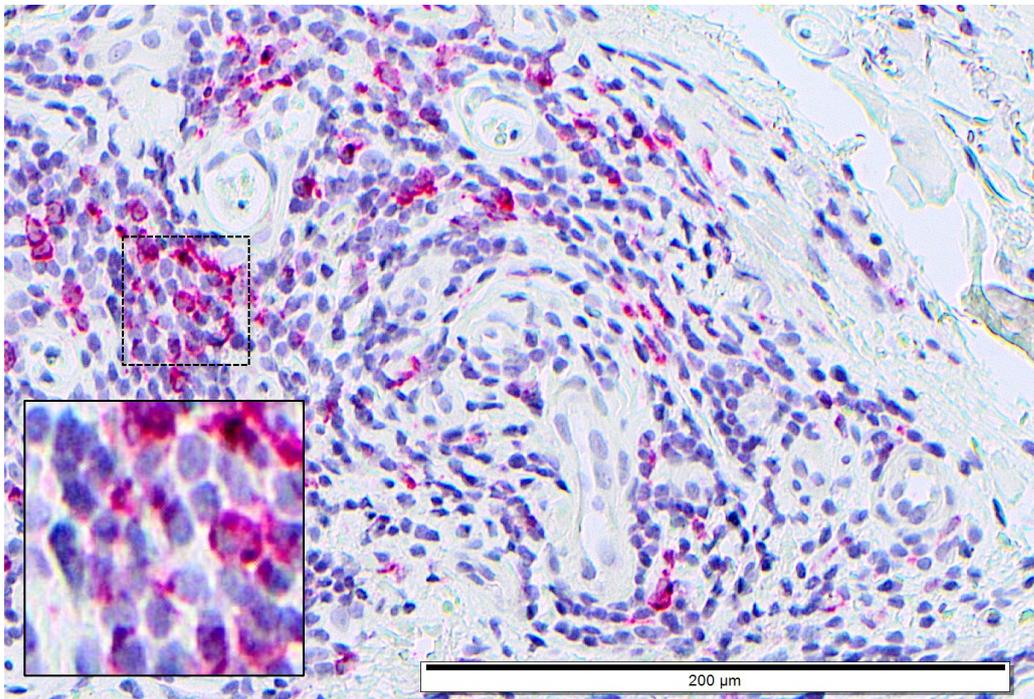


Patient 4 nach der Therapie mit Imiquimod: 12,3% TLR7+ Zellen

Bowenoide aktinische Keratose



Patient 8 vor der Therapie mit Imiquimod: 0% TLR7+ Zellen



Patient 8 nach der Therapie mit Imiquimod: 11,9% TLR7+ Zellen

Abbildung 8: TLR7-Expression in der Haut vor und nach der topischen Therapie mit Imiquimod
Repräsentativ dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Patienten mit BCC und bowenoider aktinischer Keratose vor der Therapie mit Imiquimod und danach. Vergrößerung jeweils x200.

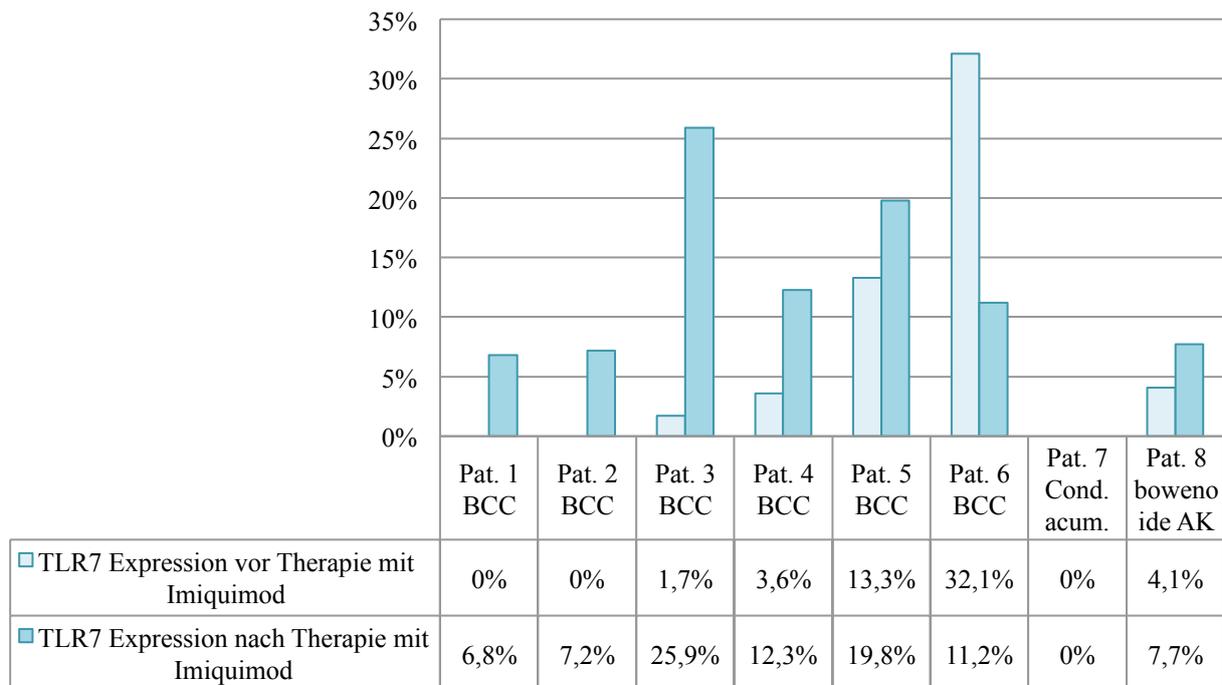


Abbildung 9: Relative TLR7-Expression vor und nach einer Therapie mit Imiquimod bei Patienten mit BCC, condyloma acuminatum und bowenoider aktinischer Keratose

3.3.1 TLR7-Expression korreliert mit einzelnen histologischen Attributen

Um herauszufinden, ob es eine mögliche Korrelation zwischen den histologischen Attributen und der TLR7-Expression vor und nach der Therapie mit Imiquimod gibt, führten wir eine statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangsummentest durch. Diese ergab einige Tendenzen:

So haben 1. die Gewebeproben, in denen sich eine Akanthose zeigt (n=3) auch eine geringere TLR7 Expression als die ohne Akanthose (n=13). 2. scheinen dilatierte dermale Kapillaren mit einer erhöhten TLR7 Expression (n=2) zu korrelieren. Und 3.: fand sich in den untersuchten Schnitten eine Nekrose, so war auch die Expression von TLR7 erhöht (n=2).

4. Diskussion

4.1 Besseres Therapieansprechen bei erhöhter TLR7-Expression?

Imiquimod ist für die topische Therapie von oberflächlichen BCCs, aktinischen Keratosen und Condylomata Acuminata zugelassen (Rote Liste® Service GmbH 2017). Die genaue molekulare Wirkweise von Imiquimod ist derzeit noch nicht bekannt. Ebenso ist nicht bekannt, ob die Expression des TLR7 durch die topische Applikation von Imiquimod induziert wird oder ob dieser schon vorher in der Haut exprimiert ist. Wir konnten zeigen, dass beim BCC ein Anstieg der TLR7-Expression ($>7,2\%$) nach einer Therapie mit Imiquimod oder eine hohe Basalexpression des Rezeptors bereits vor Beginn der Therapie ($>13,3\%$) bei jedem der Patienten auch mit einem Erfolg der Therapie, sprich mit einer Tumorfreiheit im Anschluss der Therapie, korrelierte. Möglicherweise kommt es durch ein hohes basales Expressionslevel zu einer schnelleren und effektiveren gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Es wäre interessant herauszufinden, ob die Wirksamkeit einer Therapie mit Imiquimod generell mit der Rezeptorexpression korreliert. Wenn dies der Fall wäre, so könnte man sich dies zu nutzen machen und vor Beginn einer Therapie die TLR7-Expression bestimmen. Bei vorhandener Expression könnte in der Schlussfolgerung von einem Therapieansprechen auf Imiquimod ausgegangen werden.

4.2 TLR7 als möglicher Angriffspunkt neuer Therapien

Über einige, der von uns untersuchten Hauterkrankungen, lassen sich Studien finden, welche die topische (zum Teil off-label) Behandlung mit Imiquimod untersuchten (siehe Tabelle 3). Bei diesen Erkrankungen handelt es sich unter anderem um die aktinische Keratose, maligne Lentiginen, kutane Metastasen des malignen Melanoms und Lichen planus Erkrankungen der Lippe (Steinmann, Funk et al. 2000, Deutsche dermatologische Gesellschaft 2011, Gencoglan, Inanir et al. 2011, Tio, van der Woude et al. 2017). Interessanter Weise zeigten auch genau die Hauterkrankungen, die off-label erfolgreich mit Imiquimod behandelt wurden in unserer Studie die höchste absolute Zahl der TLR7-positiven Gewebeproben (86-100% der Proben waren TLR7-positiv). Auch hier stellt sich die Frage: korreliert die TLR7-Expression mit dem

Ansprechen auf eine Therapie mit Imiquimod? Wenn ja, so könnten sich in Zukunft neue spannende Behandlungsoptionen für andere Hauterkrankungen eröffnen, welche eine hohe TLR7-Expression aufweisen. Auffallend ist, dass alle von uns untersuchten Tumorerkrankungen erfolgreich mit Imiquimod behandelt werden können.

Aber auch die Gewebeproben der Erkrankungen Alopecia areata, Lichen planus und Sarkoidose zeigten eine relativ hohe basale TLR7 Expression.

Bisher durchgeführte Studien, in denen die haarlosen Areale von Patienten mit Alopecia areata topisch mit Imiquimod behandelt wurden, waren meist wenig vielversprechend, da es selbst, wenn es anfänglich zu einem erneuten Haarwuchs kam, die Haare der Probanden nach Beendigung der Therapie wieder ausfielen (Koc, Tunca et al. 2008). Imiquimod scheint jedoch als Wirkungsverstärker bei Patienten, die nicht auf eine Therapie mit Diphenylcyclopropenonen (DCP) ansprechen, zu fungieren. Nachdem die Kopfhaut der Probanden für einige Wochen mit Imiquimod behandelt wurde, kam es, auch bei den vormals Non-Respondern, zu einer allergischen Reaktion auf DCP und im Anschluss bei 90% der Probanden zu einem erneuten Haarwuchs (Wasylyszyn and Borowska 2017). In unserer Studie zeigten 71,4% der Alopecia areata Gewebeproben eine TLR7-Expression. Es wäre interessant herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen TLR7-negativen und -positiven Patienten im Hinblick auf das Therapieansprechen gibt. In diesem Fall könnte man den an Alopecia areata erkrankten Menschen einen weiteren frustrierten Therapieversuch ersparen, oder eine neue Therapieoptionen anbieten.

Eine weitere interessante Erkrankung stellt die des Lichen planus dar. Die Ätiologie von Lichen planus gilt bisher als unbekannt. Man geht jedoch davon aus, dass es einen Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und dem Auftreten von Lichen planus gibt (Domingues, de Carvalho et al. 2015). Das Vorhandensein des PRR TLR7, welcher virale ssRNA erkennt (Heil, Hemmi et al. 2004), könnte diese These unterstützen. Denn möglicherweise zeigt sich eine erhöhte TLR7-Expression in Lichen planus Gewebeproben aufgrund eines vorherigen Kontaktes zu viraler ssRNA. Eine andere Erklärung für die erhöhte TLR7-Expression bei Lichen planus könnte aber auch das vermehrte Auftreten von nekrotischen Zellen sein. Wir untersuchten histologische Attribute in Korrelation zur TLR7 Expression und stellten die Tendenz fest, dass die TLR7-Expression mit dem Auftreten von nekrotischen Zellen korreliert. Derzeit gibt es wenige Studien, welche die Expression von TLR7 in Gewebeproben des kutanen Lichen planus untersuchen. Im Gegensatz zu Anderen (El

Tawdy and Rashed 2012) konnten wir zeigen, dass alle Lichen-Planus-Gewebsproben eine basale TLR7-Expression aufwiesen.

Gegen die Theorie, dass eine erhöhte TLR7-Expression mit einem Therapieansprechen korreliert, spricht die Tatsache, dass alle, die von uns untersucht, Condylomata TLR7-negativ waren. Eine Therapie mit Imiquimod scheint jedoch zumindest in ca. 50% der Fälle mit einem Behandlungserfolg verbunden zu sein (Sauder, Skinner et al. 2003). In unseren Vorher- Nachher-Proben hatten wir nur ein Condylom. Ein Behandlungserfolg zeigte sich nicht. Möglicherweise liegt das auch daran, dass keine TLR7-Expression nachzuweisen war. Um dem näher nachzugehen, müssten auch hier mehr Proben eingeschlossen und auf die Expression von TLR7 vor und nach einer Behandlung mit Imiquimod untersucht werden.

Äußerst interessant war auch die TLR-7 Expression in den neutrophilen Dermatosen Pyoderma gangraenosum und der Vaskulitis. Hier waren nur circa die Hälfte der Proben TLR7-positiv anfärbbar. Es zeigten sich jedoch die höchsten *relativen* Werte für TLR7 positiv angefärbte Zellen. Eine mögliche Erklärung für diese hohe positive Zellzahl könnte der hohe entzündliche Charakter der beiden Erkrankungen sein, welcher mit dem Untergang vieler Zellen einher geht. Wie weiter oben erwähnt scheint eine hohe TLR7-Expression mit dem Vorkommen nekrotischer Zellen zu korrelieren. Dadurch, dass alle Proben aus dem Archiv stammen und nicht im Rahmen der Studie gesammelt wurden, fehlt eine standardisierte klinische Korrelation. Auch wissen wir nicht, ob die Proben in einer hoch entzündlichen Phase, oder aus welchem Bereich der Läsion die Proben entnommen wurden. All dies könnte einen Einfluss auf das histologische Bild haben und dieses verzerren. Sehr interessant wäre auch ein klinisches Follow-Up, um zu beobachten, ob es für den Krankheitsverlauf einen positiven oder negativen Einfluss hat, wenn sich eine solch hohe TLR7 Expression zeigt.

4.3 TLR7 – mögliche Rolle in der Ätiologie infektiöser Hauterkrankungen

Die von uns untersuchten infektiösen Erkrankungen zeigten von allen Proben die geringste absolute TLR7 Expression (Tinea corporis: 20%, Acrodermatitis chronica atrophicans: 50%, Verruca vulgaris: 12,5%, Condylomata acuminata: 0% positive Schnitte). Dies ist überraschend und interessant, da TLR7 als PRR für die Erkennung viraler Bestandteile zuständig ist (Hemmi, Kaisho et al. 2002, Diebold, Kaisho et al. 2004, Heil, Hemmi et al.

2004, Eberle, Sirin et al. 2009) und man eigentlich erwarten würde, dass dessen Expression bei einer Infektion der Haut durch ihn aktivierende PAMPs erhöht ist.

Vielleicht ist das Fehlen des Rezeptors jedoch auch ein Hinweis auf die Genese und/oder Progression der genannten virusinduzierten Erkrankungen (*Verruca vulgaris*, *condylomata acuminata*). Womöglich kommt es bei fehlender TLR7-Expression nicht zur Aktivierung des Immunsystems und damit auch nicht zur Abwehr der Erreger. Derzeit ist wenig bekannt über die Rolle von TLRs in der Genese der genannten infektiösen Hauterkrankungen. Wie in der Einleitung erwähnt, spielte die Infektion von Taufliegen durch Pilze eine wichtige Rolle bei der Entdeckung der immunologischen Funktion von TLRs (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Und auch beim Menschen zeigen einzelne Studien, dass eine verminderte TLR-Expression im Zusammenhang mit einer chronischen Infektion der Haut durch Dermatophyten stehen könnte (Oliveira, Vasconcellos et al. 2015).

Um die Rolle von TLRs in der Genese von infektiösen Hauterkrankungen tiefergehend zu klären, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig.

4.4 TLR7 - ein Marker zur Unterscheidung von BCC, SCC und BSC?

In unserer Studie suchten wir nach einer Möglichkeit der Differenzierung, der malignen epithelialen Tumoren SCC und BCC, sowie dem intermediärtumor BSC mittels TLR7 als möglichen Marker. Es zeigte sich, dass sowohl BCCs als auch SCCs im tumoralen und peritumoralen immunozellulären Infiltrat TLR7-positiv anfärbbar sind. So waren 45,8% der SCC Gewebeproben TLR7-positiv und 30,4% aller BCCs. Die Tumorzellen selbst exprimierten kein TLR7. Während Mühleisen et al. auf der mRNA Ebene zeigen konnten, dass die Expression des TLR7 in SCCs um ein vielfaches höher als in BCCs ist (Muehleisen, Jiang et al. 2012), konnten wir dieses Ergebnis auf der Proteinebene nicht wiederholen. TLR7 lässt sich somit nicht als immunhistochemischer Marker zur Differenzierung von BCC und SCC heranziehen. Wir waren jedoch nicht die Einzigen, die in den letzten Jahren nach einem immunhistochemischen Marker zur Differenzierung der genannten Tumoren suchten. In den letzten Jahren wurden einige Studien durchgeführt, um passende Marker zu finden. Hier sind der monoklonale EpCam-detektierende Antikörper *Ep-CAM/Epithelial Specific Antigen* (Ber-EP4), und das *epitheliale membran Antigen* (EMA) besonders interessant. Das epitheliale

Zelladhäsionsmolekül EpCam (CD326) zeigt im Zytoplasma von BCCs eine starke Anfärbbarkeit durch Ber-EP4. SCCs exprimieren dieses Adhäsionsmolekül weitestgehend nicht (Swanson, Fitzpatrick et al. 1998, Dasgeb, Mohammadi et al. 2013).

Einen möglichen Marker zur Detektion von SCCs stellt **EMA** dar. Dieses färbt keine BCC-Tumorzellen, SCCs hingegen werden zu 82,7%-95,6% (je nach Studie) positiv markiert (Beer, Shepherd et al. 2000, Ramezani, Mohamadzaheeri et al. 2016).

So wie wir suchten auch Beer et al. nach einem Marker um BSC von BCC und SCC zu unterscheiden. Sie untersuchten unter anderem die Marker EMA, sowie Ber-EP4 und auch sie konnten zeigen, dass EMA als Marker für SCCs und Ber-EP4 als Marker für BCCs dienen kann. Auch die von ihnen gefärbten BSCs waren alle Ber-EP4-positiv und alle Proben (bis auf eine) EMA-negativ. Nach Beer et al. kann man die Diagnose BSC stellen, wenn in einer Gewebeprobe histologische Anteile eines BCC sowie SCC vorhanden sind und sich diese Ber-EP4-positiv aber EMA-negativ anfärben lässt (Beer, Shepherd et al. 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Ber-EP4 und EMA sowohl BCCs als auch SCCs deutlich spezifischer immunhistochemisch färben lassen als durch TLR7. Zukünftige Studien könnten zeigen, inwiefern die Stärke der EMA-Expression mit dem Grad der Differenzierung der Tumoren assoziiert ist und ob diese dann auch mit der Expression von TLR7 korreliert. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass in SCCs eine hohe TLR7-Expression mit einem höheren Grad der Differenzierung assoziiert ist. Falls EMA bei allen SCCs, unabhängig vom Grad der Differenzierung exprimiert wird, so könnte in Zukunft eine zusätzliche Färbung mit TLR7 weitere Einsichten bezüglich der Prognose und bei der Wahl der Therapiemodalitäten hilfreich sein.

4.5 Welche Zellen exprimieren TLR7?

Wir versuchten mithilfe von immunfluoreszenz Doppelfärbungen weitere Einblicke bezüglich der Zellen zu erhalten, die TL7 exprimieren. Wir konnten zeigen, dass die TLR7-positiven Immunzellen des peritumoralen Infiltrates von BCCs, SCCs und BSCs in enger Interaktion mit CD2-positiven Zellen stehen. Eine Co-expression mit CD2, der als Oberflächenmarker von T-Zellen und NK-Zellen dient (Heinrich, Müller et al. 2014), zeigte sich jedoch nicht.

Wir konnten mittels unserer immunfluoreszenz Doppelfärbungen keinen Hinweis auf eine Expression von TLR7 auf T- und NK-Zellen finden.

TLR7 scheint vielmehr auf der Oberfläche von *plasmazytoiden dendritischen Zellen* (pDC), B-Zellen und fibroblast ähnlichen Zellen exprimiert zu werden (Kadowaki, Ho et al. 2001, Hornung, Rothenfusser et al. 2002, Ni, Ding et al. 2015). Passende Marker zur Darstellung von pDC wären zum Beispiel CD123, BDCA-2 oder BDCA-4 gewesen, welche Oberflächenmarker von pDC sind (Dzionek, Fuchs et al. 2000, McKenna, Beignon et al. 2005).

Weiter scheinen pDC nicht nur TLR7 exprimierende Zellen, sondern zudem die primären Sensoren von topisch appliziertem Imiquimod zu sein (Garzorz-Stark, Lauffer et al. 2018).

4.6 TLR im Tumorgebiet – positiv oder negativ prädiktiv?

Wie bereits erwähnt, konnten wir bei genauerer Betrachtung der TLR7 Expression unter den von uns gefärbten SCCs zeigen, dass die gut differenzierten SCCs, verglichen mit den weniger gut differenzierten, eine höhere TLR7-Expression im tumoralen und/oder im peritumoralen immunzellulären Infiltrat aufwiesen. In SCCs ist ein niedriger Differenzierungsstatus mit einer schlechteren Prognose des Patienten assoziiert (Jennings and Schmults 2010). Auch Zelllinien des malignen Melanoms exprimieren TLR7 und eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene scheint mit einer hohen Expression von funktionellen Markern des Immunsystems, sowie einer längeren Überlebenszeit assoziiert zu sein (Saint-Jean, Knol et al. 2011, Zhang, Yan et al. 2017).

Man könnte hieraus schlussfolgern, dass die Expression von TLR7 in der Mikroumgebung von Tumoren mit einer besseren Prognose korreliert. Hier ist jedoch eine differenzierte Betrachtung nötig, denn TLRs scheinen sowohl karzinogene als auch anti-karzinogene Effekte zu haben, was ihnen auch den Titel des zweiseitigen Schwertes eingebracht hat (Basith, Manavalan et al. 2012). Kürzlich zeigten Ni et al., dass eine hohe TLR7 Expression in der peritumoralen Umgebung und eine niedrige Expression im Tumorzentrum bei oralen SCCs mit einem besseren Status der Differenzierung, sowie einem längeren Überleben assoziiert ist (Ni, Ding et al. 2015). Allerdings zeigte sich die höchste TLR7 Expression in den Tumoren, die den höchsten Grad der Dysplasie aufwiesen und eine hohe TLR7 Expression korrelierte positiv mit einer kürzeren Überlebenszeit. Wird der TLR7 hingegen nicht von den Tumorzellen, sondern

von Fibroblast-ähnlichen Zellen im Stroma der Tumorumgebung exprimiert, so korreliert dies mit einem besseren Outcome (Ni, Ding et al. 2015).

Die zum Teil konträren Ergebnisse bezüglich der Funktion von TLRs (kanzerogen und nicht kanzerogen) in den unterschiedlichen Tumorentitäten scheinen also auch von der Lokalisation der TLRs abhängig zu sein. So könnte man schlussfolgern, dass die Expression und Aktivierung von TLRs auf Tumorzellen und Zellen des angeborenen Immunsystems eher zu Entzündungen, zur Tumorangiogenese und einem erhöhten Überleben der Tumorzellen führt. Die Expression und Aktivierung von TLRs auf Zellen des adaptiven Immunsystems führe hingegen eher zu einer antikanzerogenen, zellvermittelten Immunantwort (Zhou, McFarland-Mancini et al. 2009).

In den letzten Jahrzehnten erfolgte eine intensive Forschung im Bereich der PRRs und besonders der TLRs. Nichtsdestotrotz bleibt die exakte Rolle der TLRs, besonders im Hinblick auf die Genese von Tumoren, unklar. Es sind noch viele weitere Studien nötig, um diese Frage zu klären und eventuell positiven Nutzen in der Therapie von Karzinomen daraus zu ziehen. Vor dem Beginn einer Therapie mit TLR7-Agonisten könnte es in Zukunft jedoch unseres Erachtens wichtig werden, sich das Expressionsmuster der Rezeptoren im Vorfeld genauer anzuschauen.

5. Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai (2011). Cellular and molecular immunology - 7th edition. Philadelphia, Saunders W.B.

Ahn, M. Y., S. M. Kwon, H. H. Cheong, J. H. Park, J. Lee, S. K. Min, S. G. Ahn and J. H. Yoon (2012). "Toll-like receptor 7 agonist, imiquimod, inhibits oral squamous carcinoma cells through apoptosis and necrosis." J Oral Pathol Med **41**(7): 540-546.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-738.

Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, Y. Lobet, J. Anguita, R. T. Schoen, R. Medzhitov, E. Fikrig and R. A. Flavell (2002). "Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice." Nat Med **8**(8): 878-884.

Altmeyers Enzyklopädie. (2017, 30.06.2017). "Ekzem (Übersicht)." from <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/ekzem-ubersicht-1106>.

Altmeyers Enzyklopädie. (2017, 09.08.2017). "Lichen sclerosus (Übersicht) L90.4." Retrieved 18.10.2017, from <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/lichen-sclerosus-ubersicht-2345>.

Altmeyers Enzyklopädie. (2017, 09.08.2017). "Tinea corporis." from <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/tinea-corporis-3956>.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. (2006). "Leitlinien der Deutschen STD-Gesellschaft

Condylomata acuminata und andere HPV-assoziierte Krankheitsbilder von Genitale, Anus und Harnröhre." from http://www.dstig.de/images/059-001_S1_Condylomata_acuminata_und_andere_HPV-assoziierte_Krankheitsbilder_des_Genitale_und_der_Harnroehre_07-2006_07_2011.klein.pdf.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)- Ständige Kommission Leitlinien. (2013). "Langfassung der Leitlinie "Basalzellkarzinom der Haut"." Retrieved 05.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0211_S2k_Basalzellkarzinom_2013-verlaengert.pdf

Aspord, C., L. Tramcourt, C. Leloup, J.-P. Molens, M.-T. Leccia, J. Charles and J. Plumas (2014). "Imiquimod Inhibits Melanoma Development by Promoting pDC Cytotoxic Functions and Impeding Tumor Vascularization." Journal of Investigative Dermatology **134**(10): 2551-2561.

Aszterbaum, M., A. Rothman, R. L. Johnson, M. Fisher, J. Xie, J. M. Bonifas, X. Zhang, M. P. Scott and E. H. Epstein, Jr. (1998). "Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome." J Invest Dermatol **110**(6): 885-888.

Basith, S., B. Manavalan, T. H. Yoo, S. G. Kim and S. Choi (2012). "Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense." Arch Pharm Res **35**(8): 1297-1316.

Beer, T. W., P. Shepherd and J. M. Theaker (2000). "Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin." Histopathology **37**(3): 218-223.

Bell, J. K., G. E. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzone, D. R. Davies and D. M. Segal (2003). "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." Trends Immunol **24**(10): 528-533.

Bieback, K., E. Lien, I. M. Klagge, E. Avota, J. Schneider-Schaulies, W. P. Duprex, H. Wagner, C. J. Kirschning, V. Ter Meulen and S. Schneider-Schaulies (2002). "Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling." J Virol **76**(17): 8729-8736.

Blasius, A. L. and B. Beutler (2010). "Intracellular toll-like receptors." Immunity **32**(3): 305-315.

Bong, A. B., B. Bonnekoh, I. Franke, M. Schon, J. Ulrich and H. Gollnick (2002). "Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma." Dermatology **205**(2): 135-138.

Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.

Chockalingam, A., J. C. Brooks, J. L. Cameron, L. K. Blum and C. A. Leifer (2009). "TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA." Immunol Cell Biol **87**(3): 209-217.

Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii and S. Akira (2005). "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin." J Exp Med **201**(1): 19-25.

Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda and A. Mantovani (2009). "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability." Carcinogenesis **30**(7): 1073-1081.

Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock and R. W. Finberg (2003). "Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2." J Virol **77**(8): 4588-4596.

Dasgeb, B., T. M. Mohammadi and D. R. Mehregan (2013). "Use of Ber-EP4 and Epithelial Specific Antigen to Differentiate Clinical Simulators of Basal Cell Carcinoma." Biomark Cancer **5**: 7-11.

Deutsche dermatologische Gesellschaft. (2008). "Kutaner Lupus erythematodes " Retrieved 18.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-060_abgelaufen.pdf.

Deutsche Dermatologische Gesellschaft. (2008, 2013). "Leitlinie Rosazea " Retrieved 17.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-0651_S1_Rosazea_2014-04-verlaengert.pdf.

Deutsche dermatologische Gesellschaft. (2011). "Leitlinie zur Behandlung der aktinischen Keratosen." from http://www.escf-network.eu/fileadmin/user_upload/Files/Leitlinie_AK_K5_Ds.pdf.

Deutsche Dermatologische Gesellschaft. (2014, 07/2014). "S2k Leitlinie Diagnostik und Therapie der zirkumskripten Sklerodermie." Retrieved 17.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-0661_S2k_zirkumskripte_Sklerodermie_2014-07_01.pdf.

Deutsche Dermatologische Gesellschaft / Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft. (2008). "Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft - Tinea der freien Haut." Retrieved 17.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-002-abgelaufen_01.pdf.

- Deutsche Gesellschaft für Dermatologie. (2016). "Kutane Lyme Borreliose." Retrieved 17.10.2017.
- Deutsche Krebsgesellschaft. (2017). "S2k - Leitlinie - Kutane Lymphome (ICD10 C82 - C86)." Retrieved 17.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0271_S2k_Kutane_Lymphome_2017-10.pdf.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira and C. R. E. Sousa (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* **303**(5663): 1529-1531.
- Dirschka, T., R. Hartwig and C. Oster-Schmidt (2011). *Klinikleitfaden Dermatologie*. München, Elsevier GmbH.
- Domingues, R., G. C. de Carvalho, L. M. da Silva Oliveira, E. Futata Taniguchi, J. M. Zimbres, V. Aoki, A. J. da Silva Duarte and M. N. Sato (2015). "The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus." *Br J Dermatol* **172**(1): 48-55.
- Drobits, B., M. Holcman, N. Amberg, M. Swiecki, R. Grundtner, M. Hammer, M. Colonna and M. Sibilica (2012). "Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells." *J Clin Invest* **122**(2): 575-585.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck and J. Schmitz (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." *J Immunol* **165**(11): 6037-6046.
- Eberle, F., M. Sirin, M. Binder and A. H. Dalpke (2009). "Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors." *Eur J Immunol* **39**(9): 2537-2547.
- El Tawdy, A. and L. Rashed (2012). "Downregulation of TLR-7 receptor in hepatic and non-hepatic patients with lichen planus." *Int J Dermatol* **51**(7): 785-789.
- Enzyklopädie Dermatologie. (2017, 09.08.2017). "Morbus Bowen." from <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/morbus-bowen-4621>.
- Florin, V., E. Desmedt, S. Vercambre-Darras and L. Mortier (2012). "Topical treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma using combined imiquimod and 5-fluorouracil." *Invest New Drugs* **30**(4): 1641-1645.
- Franz, R., N. Ritter, R. Hein, T. Biedermann, M. Al-Sisi, K. Eyerich, N. Garzorz-Stark and C. Andres (2017). "Toll-Like Receptor 7 Staining in Malignant Epithelial Tumors." *Am J Dermatopathol*.
- Gailani, M. R., M. Stahle-Backdahl, D. J. Leffell, M. Glynn, P. G. Zaphiropoulos, C. Pressman, A. B. Uden, M. Dean, D. E. Brash, A. E. Bale and R. Toftgard (1996). "The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas." *Nat Genet* **14**(1): 78-81.
- Garcia, C., E. Poletti and A. N. Crowson (2009). "Basosquamous carcinoma." *J Am Acad Dermatol* **60**(1): 137-143.
- Garzorz-Stark, N., F. Lauffer, L. Krause, J. Thomas, A. Atenhan, R. Franz, S. Roenneberg, A. Boehner, M. Jargosch, R. Batra, N. S. Mueller, S. Haak, C. Gross, O. Gross, C. Traidl-Hoffmann, F. J. Theis, C. B. Schmidt-Weber, T. Biedermann, S. Eyerich and K. Eyerich (2018). "Toll-like receptor 7/8 agonists stimulate plasmacytoid dendritic cells to initiate TH17-deviated acute contact dermatitis in human subjects." *J Allergy Clin Immunol* **141**(4): 1320-1333.e1311.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." *Nature* **351**(6325): 355-356.

Geginat, G. H., Herbert; Schlüter, Dirk; Wendt, Constanze; Bob, Alexander; Bob, Konstantin (2014). Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart, Dörries, Rüdiger.

Gencoglan, G., I. Inanir, O. Sahin and K. Gunduz (2011). "Imiquimod 5% cream for isolated lichen planus of the lip." J Dermatolog Treat **22**(1): 55-59.

Gilleron, M., V. F. Quesniaux and G. Puzo (2003). "Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response." J Biol Chem **278**(32): 29880-29889.

Gkoulioni, V., A. Eleftheriadou, I. Yiotakis, E. Ferekidou, A. Chrisovergis, A. Lazaris and D. Kandiloros (2010). "The efficacy of imiquimod on dysplastic lesions of the oral mucosa: an experimental model." Anticancer Res **30**(7): 2891-2896.

Gorney, B. P. and R. Polori (2004). "A case of Bowenoid papulosis of the penis successfully treated with topical imiquimod cream 5%." Int J STD AIDS **15**(12): 833-835.

Gorden, K. K., X. Qiu, J. J. Battiste, P. P. Wightman, J. P. Vasilakos and S. S. Alkan (2006). "Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines." J Immunol **177**(11): 8164-8170.

Gray, E. E., D. Winship, J. M. Snyder, S. J. Child, A. P. Geballe and D. B. Stetson (2016). "The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA." Immunity **45**(2): 255-266.

Guha, M. (2012). "Anticancer TLR agonists on the ropes." Nat Rev Drug Discov **11**(7): 503-505.

Hanna, E., R. Abadi and O. Abbas (2016). "Imiquimod in dermatology: an overview." Int J Dermatol **55**(8): 831-844.

Hansson, G. K. and K. Edfeldt (2005). "Toll to be paid at the gateway to the vessel wall." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1085-1087.

Hartmann, G., S. Endres, S. Rothenfufler, B. Jahrsdörfer and A. Krug (2001). "CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA." Dtsch Arztebl International **98**(15): 981-985.

Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-1103.

Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-1529.

Heinrich, P. C., M. Müller and L. Graeve (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin Heidelberg, Springer Verlag

Hemmi, H. and S. Akira (2005). "TLR signalling and the function of dendritic cells." Chem Immunol Allergy **86**: 120-135.

Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-745.
- Hengge, U. R., S. Esser, T. Schultewolter, C. Behrendt, T. Meyer, E. Stockfleth and M. Goos (2000). "Self-administered topical 5% imiquimod for the treatment of common warts and molluscum contagiosum." Br J Dermatol **143**(5): 1026-1031.
- Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter and H. Wagner (2004). "Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11416-11421.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **168**(9): 4531-4537.
- Hoving, J. C., G. J. Wilson and G. D. Brown (2014). "Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity." Cell Microbiol **16**(2): 185-194.
- Janeway, C. A., Jr. (2013). "Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold spring harb symp quant biol. 1989. 54: 1-13." J Immunol **191**(9): 4475-4487.
- Jennings, L. and C. D. Schmults (2010). "Management of high-risk cutaneous squamous cell carcinoma." J Clin Aesthet Dermatol **3**(4): 39-48.
- Jiang, S., X. Li, N. J. Hess, Y. Guan and R. I. Tapping (2016). "TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling." J Immunol **196**(9): 3834-3841.
- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan and Y. J. Liu (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-869.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.
- Kishi, C., A. Shimizu, M. Kato, H. Amano and O. Ishikawa (2015). "Successful treatment of genital Bowen's disease with imiquimod 5% cream." Int J STD AIDS **26**(10): 752-754.
- Koc, E., M. Tunca, A. Akar and Z. Kurumlu (2008). "Lack of efficacy of topical imiquimod in the treatment of patchy alopecia areata." Int J Dermatol **47**(10): 1088-1089.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson and R. W. Finberg (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol **1**(5): 398-401.
- Lee, S. M., K. H. Kok, M. Jaume, T. K. Cheung, T. F. Yip, J. C. Lai, Y. Guan, R. G. Webster, D. Y. Jin and J. S. Peiris (2014). "Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(10): 3793-3798.
- Leitlinienprogramm Onkologie. (2016). "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms." Retrieved 25.10.2017, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-038ol_1_S3_Harnblasenkarzinom_2016-12.pdf.

- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-983.
- Li, K., N. L. Li, D. Wei, S. R. Pfeffer, M. Fan and L. M. Pfeffer (2012). "Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates." Hepatology **55**(3): 666-675.
- Li, V. W., W. W. Li, K. E. Talcott and A. W. Zhai (2005). "Imiquimod as an antiangiogenic agent." J Drugs Dermatol **4**(6): 708-717.
- Lu, H., W. M. Wagner, E. Gad, Y. Yang, H. Duan, L. M. Amon, N. Van Denend, E. R. Larson, A. Chang, H. Tufvesson and M. L. Disis (2010). "Treatment failure of a TLR-7 agonist occurs due to self-regulation of acute inflammation and can be overcome by IL-10 blockade." J Immunol **184**(9): 5360-5367.
- Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov and A. Iwasaki (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **198**(3): 513-520.
- Majewski, S., M. Marczak, B. Mlynarczyk, B. Benninghoff and S. Jablonska (2005). "Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis." Int J Dermatol **44**(1): 14-19.
- Mandekou-Lefaki, I., F. Delli, T. Koussidou-Eremondi, O. Mourellou-Tsatsou and A. Dionyssopoulos (2005). "Imiquimod 5% cream: a new treatment for Bowen's disease." Int J Tissue React **27**(1): 31-38.
- Marks, R., K. Gebauer, S. Shumack, M. Amies, J. Bryden, T. L. Fox and M. L. Owens (2001). "Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: results of a multicenter 6-week dose-response trial." J Am Acad Dermatol **44**(5): 807-813.
- Matsushima, N., T. Tanaka, P. Enkhbayar, T. Mikami, M. Taga, K. Yamada and Y. Kuroki (2007). "Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors." BMC Genomics **8**: 124.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- McKenna, K., A. S. Beignon and N. Bhardwaj (2005). "Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity." J Virol **79**(1): 17-27.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-397.
- Motta, V., F. Soares, T. Sun and D. J. Philpott (2015). "NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels." Physiol Rev **95**(1): 149-178.
- Muehleisen, B., S. B. Jiang, J. A. Gladsjo, M. Gerber, T. Hata and R. L. Gallo (2012). "Distinct innate immune gene expression profiles in non-melanoma skin cancer of immunocompetent and immunosuppressed patients." PLoS One **7**(7): e40754.
- Murphy, K., P. Travers and M. Walport (2008). Janeway's immunobiology - 7th edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.

Ni, Y. H., L. Ding, D. Y. Zhang, Y. Y. Hou, X. Huang and Q. Hu (2015). "Distinct expression patterns of Toll-like receptor 7 in tumour cells and fibroblast-like cells in oral squamous cell carcinoma." Histopathology **67**(5): 730-739.

Ockenfels, H. M. (2016). "Therapeutisches Management kutaner und genitaler Warzen." J Dtsch Dermatol Ges **14**(9): 892-900.

Oliveira, C. B., C. Vasconcellos, N. Y. Sakai-Valente, M. N. Sotto, F. G. Luiz, W. Belda Junior, G. Sousa Mda, G. Benard and P. R. Criado (2015). "Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 expression of keratinocytes from patients with localized and disseminated dermatophytosis." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **57**(1): 57-61.

Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov (2009). "Toll-like receptors and cancer." Nat Rev Cancer **9**(1): 57-63.

Ramezani, M., E. Mohamadzaheeri, S. Khazaei, F. Najafi, A. Vaisi-Raygani, M. Rahbar and M. Sadeghi (2016). "Comparison of EMA, CEA, CD10 and Bcl-2 Biomarkers by Immunohistochemistry in Squamous Cell Carcinoma and Basal Cell Carcinoma of the Skin." Asian Pac J Cancer Prev **17**(3): 1379-1383.

Regan, T., K. Nally, R. Carmody, A. Houston, F. Shanahan, J. Macsharry and E. Brint (2013). "Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages." J Immunol **191**(12): 6084-6092.

Ridnour, L. A., R. Y. Cheng, C. H. Switzer, J. L. Heinecke, S. Ambs, S. Glynn, H. A. Young, G. Trinchieri and D. A. Wink (2013). "Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity." Clin Cancer Res **19**(6): 1340-1346.

Rote Liste® Service GmbH. (2017). "Aldara® 5 % Creme." Retrieved 29.09.2017, from <https://online.rote-liste.de/suche/praep/16273/Aldara%C2%AE%205%25%20Creme>.

Saint-Jean, M., A. C. Knol, J. M. Nguyen, A. Khammari and B. Dreno (2011). "TLR expression in human melanoma cells." Eur J Dermatol **21**(6): 899-905.

Sato, Y., Y. Goto, N. Narita and D. S. Hoon (2009). "Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment." Cancer Microenviron **2 Suppl 1**: 205-214.

Sauder, D. N., R. B. Skinner, T. L. Fox and M. L. Owens (2003). "Topical imiquimod 5% cream as an effective treatment for external genital and perianal warts in different patient populations." Sex Transm Dis **30**(2): 124-128.

Schon, M. P., M. Schon and K. N. Klotz (2006). "The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion." J Invest Dermatol **126**(6): 1338-1347.

Schon, M. P., B. G. Wienrich, C. Drewniok, A. B. Bong, J. Eberle, C. C. Geilen, H. Gollnick and M. Schon (2004). "Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod." J Invest Dermatol **122**(5): 1266-1276.

Schulze, H. J., B. Cribier, L. Requena, J. Reifemberger, C. Ferrandiz, A. Garcia Diez, V. Tebbs and S. McRae (2005). "Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe." Br J Dermatol **152**(5): 939-947.

Schwab, M. (2012). Encyclopedia of cancer. Berlin, Springer Verlag.

Steinmann, A., J. O. Funk, G. Schuler and P. von den Driesch (2000). "Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanomametastasis." Journal of the American Academy of Dermatology **43**(3): 555-556.

Swanson, P. E., M. M. Fitzpatrick, J. H. Ritter, E. J. Glusac and M. R. Wick (1998). "Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens." J Cutan Pathol **25**(3): 153-159.

Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell and B. Beutler (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3516-3521.

Tio, D., J. van der Woude, C. A. C. Prinsen, E. P. Jansma, R. Hoekzema and C. van Montfrans (2017). "A systematic review on the role of imiquimod in lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: need for standardization of treatment schedule and outcome measures." J Eur Acad Dermatol Venereol **31**(4): 616-624.

Tsung, A., S. Tohme and T. R. Billiar (2014). "High-mobility group box-1 in sterile inflammation." J Intern Med **276**(5): 425-443.

Urosevic, M., R. Dummer, C. Conrad, M. Beyeler, E. Laine, G. Burg and M. Gilliet (2005). "Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid dendritic cells following imiquimod treatment." J Natl Cancer Inst **97**(15): 1143-1153.

Vidal, D., X. Matias-Guiu and A. Alomar (2004). "Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis." Br J Dermatol **151**(3): 656-662.

Voet, D., J. G. Voet, A. Beck-Sickinger and C. W. Pratt (2010). Lehrbuch der Biochemie. Weinheim, Annette Beck-Sickinger.

Wasylyszyn, T. and K. Borowska (2017). "Possible advantage of imiquimod and diphenylcyclopropanone combined treatment versus diphenylcyclopropanone alone: An observational study of nonresponder patients with alopecia areata." Australas J Dermatol **58**(3): 219-223.

Weedon, D. (2002). Skin pathology. London, Churchill Livingstone.

Wermker, K., N. Roknic, K. Goessling, M. Klein, H. J. Schulze and C. Hallermann (2015). "Basosquamous carcinoma of the head and neck: clinical and histologic characteristics and their impact on disease progression." Neoplasia **17**(3): 301-305.

Williams, H. C., F. Bath-Hextall, M. Ozolins, S. J. Armstrong, G. B. Colver, W. Perkins and P. S. Miller (2017). "Surgery Versus 5% Imiquimod for Nodular and Superficial Basal Cell Carcinoma: 5-Year Results of the SINS Randomized Controlled Trial." J Invest Dermatol **137**(3): 614-619.

Wolff, F., A. Loipetzberger, W. Gruber, H. Esterbauer, F. Aberger and A. M. Frischauf (2013). "Imiquimod directly inhibits Hedgehog signalling by stimulating adenosine receptor/protein kinase A-mediated GLI phosphorylation." Oncogene **32**(50): 5574-5581.

Zani, I. A., S. L. Stephen, N. A. Mughal, D. Russell, S. Homer-Vanniasinkam, S. B. Wheatcroft and S. Ponnambalam (2015). "Scavenger receptor structure and function in health and disease." Cells **4**(2): 178-201.

Zhang, M., Z. Yan, J. Wang and X. Yao (2017). "Toll-like receptors 7 and 8 expression correlates with the expression of immune biomarkers and positively predicts the clinical outcome of patients with melanoma." Onco Targets Ther **10**: 4339-4346.

Zhou, M., M. M. McFarland-Mancini, H. M. Funk, N. Hussein-zadeh, T. Mounajjed and A. F. Drew (2009). "Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors." Cancer Immunol Immunother **58**(9): 1375-1385.

Danksagungen

Mein größter Dank gilt Dr. Natalie Garzorz-Stark für die tolle Betreuung und die vielen Stunden, die Sie als meine Mentorin aufgewandt hat um mich mit Rat und Tat zu unterstützen. Und das neben den vielen Projekten die sie gleichzeitig meistert. Auch meinem Dr. Vater Prof. Dr. Kilian Eyerich und Prof. Dr. Hein möchte ich danken. Sie haben in mir das Interesse an der Dermatologie geweckt, und die Chance gegeben an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein zu promovieren.

Für die Hilfe bei der Sammlung von Gewebeproben bedanke ich mich bei Dr. Mohammed Al-Asisi. An Susanne Bogner gilt mein Dank für die Unterstützung beim Umgang mit dem Färbeautomaten.

Last but not least bedanke ich mich bei meiner Eltern und bei meinem Partner, für die immer währende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Nationalität: deutsch
Geburtsort: Ingolstadt
Geburtstag: 11.06.1991

Klinische Erfahrung

01/2018-derzeit
Assistenzärztin im Fach Innere Medizin
Klinikum Landshut

Ausbildung

10/2013-05/2017
Technische Universität München
3. Staatsexamen 05/2017, Note 2
2. Staatsexamen 04/2016, Note 2

04/2013-07/2013 Universität zu Lübeck

10/2010 – 09/2012 Studium Humanmedizin Philipps-Universität
Marburg
1. Staatsexamen Note 3

06/2010 Hochschulzugangsberechtigung
Gymnasium Herderschule, Lüneburg
Niedersächsisches Zentralabitur

Veröffentlichungen

Paper:

Franz, R., N. Ritter, R. Hein, T. Biedermann, M. Al-Sisi, K. Eyerich,
N.Garzorz-Stark and C. Andres (2017). "Toll-Like Receptor 7 Staining
in Malignant Epithelial Tumors." Am J Dermatopathol.

Posterpräsentation 26th Annual ESDR Meeting:

Ritter N., N. Garzorz-Stark, Franz R., Hein R., Biedermann T., Al-Sisi
M., Eyerich K., Andres C (2016). "Toll-like Receptor 7: a new marker for
differentiation of nonmelanoma skin cancer?"