

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French

**Biologie, Physiologie und Anatomie des
komplexesten humanen Kommensalen – *Demodex* spp.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Benjamin Maximilian Louis Montgomery Clanner-Engelshofen

aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Markus Reinholz
Mitberichterstatter:	Privatdozentin Dr. Sophia Horster Professor Dr. Heinrich Jung Professor Dr. Matthias Kappler
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	19.10.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Biologie, Physiologie und Anatomie des
komplexesten humanen Kommensalen – *Demodex* spp.**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21. Oktober 2020

Benjamin Clanner-Engelshofen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Publikationsliste	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Geschichte	1
1.2. Natürliches Vorkommen und Phylogenie	1
1.3. Anatomie	2
1.3.1. Entwicklung	2
1.3.2. Gnathosoma	3
1.3.3. Podosoma	3
1.3.4. Opisthosoma.....	3
1.4. Endobakterien	5
1.5. Potenzielle Humanpathogenität und assoziierte Krankheiten	5
1.5.1. Extraktionsverfahren	5
1.5.2. Primäre Demodikosen	5
1.5.2.1. Pityriasis folliculorum	6
1.5.2.2. Rosazea-ähnliche Demodikose.....	6
1.5.2.3. Granulomatöse Demodikose.....	6
1.5.3. Sekundäre Demodikosen.....	6
1.5.4. Therapeutische Ansätze	6
2. Veröffentlichung I.....	8
2.1. Fragestellung und Zielsetzung.....	8
2.2. Methodik	8
2.3. Ergebnisse und Diskussion	8
3. Veröffentlichung II.....	10
3.1. Fragestellung und Zielsetzung.....	10
3.2. Methodik	10
3.3. Ergebnisse und Diskussion	11
4. Ausblick	12
5. Zusammenfassung.....	13
6. Veröffentlichung I.....	17
7. Veröffentlichung II.....	19
8. Literaturverzeichnis.....	21
9. Danksagung	24

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
16S-Sequenzierung	Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens zur phylogenetischen Verwandtschaftsbestimmung
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. oleronius</i>	<i>Bacillus oleronius</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>B. simplex</i>	<i>Bacillus simplex</i>
BHI	Brain-heart-infusion, reichhaltiges Nährmedium
BODIPY	Bordipyromethen, hier 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diazas-Indacen, bzw. Filterset für dieses Fluorophor
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. kroppenstedtii</i>	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>
CKSM	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i> -Selektivmedium
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>D. brevis</i>	<i>Demodex brevis</i>
<i>D. folliculorum</i>	<i>Demodex folliculorum</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol bzw. Filterset für dieses Fluorophor
dG	Desoxyguanosin
DMARDs	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs, Basismedikation der rheumatischen Arthritis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dT	Thymidin
e.g.	exempli gratia, zum Beispiel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, EGF-Rezeptor
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus
EtOH	Ethanol
FAS	Fettsäure-Synthase
g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der Erdanziehungskraft
GC content	Guanin+Cytosin-Gehalt
GFP	green fluorescent protein bzw. Filterset für dieses Fluorophor
gr.	griechisch

h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
Hoechst 33258	2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazolyl)benzimidazoltrihydrochlorid, Fluorophor
lat.	lateinisch
MALDI(-TOF)	Matrix-assisted laser desorption/ionization(-time of flight), massenspektrometrisches Verfahren
merge	Überlagerung mikroskopischer Bilder mit unterschiedlicher Anregung
mg	Milligramm
min	Minute
MIS	Mikrobielles Identifikationssystem
ml	Milliliter
mm	Millimeter
<i>nanI</i>	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i> -spezifisches Sialidase/Neuraminidase-Gen
PBS	Phosphate buffered saline, phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Maß des sauren oder basischen Charakters einer wässrigen Lösung
PI	Propidiumiodid, Fluorophor
RCM	Reinforced clostridial medium, Clostridiennährmedium
REP	repetitive element
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> kodiert für die β-Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurylsulfat
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
subsp.	Subspezies
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
T _m	Primer-Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Unbedenklichkeitserklärung
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht
w/w	Gewichtsanteil
ρ	gr. Buchstabe rho, Symbol für die Dichte

Publikationsliste

Originalarbeiten als Erstautor

1. **Clanner-Engelshofen BM**, Ruzicka T, Reinholz M. Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp. *Exp Appl Acarol*. 2018;76(1):71-80. *JIF* (2018): 1,8
2. Heppt MV*, **Clanner-Engelshofen BM***, Marsela E, Wessely A, Kammerbauer C, Przybilla B, French LE, Berking C, Reinholz M. Comparative analysis of the phototoxicity induced by BRAF inhibitors and alleviation through antioxidants. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2019 [epub ahead of print]. DOI: 10.1111/phpp.12520. *JIF* (2018): 2,3
*contributed equally
3. **Clanner-Engelshofen BM**, French LE, Reinholz M. *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019 [epub ahead of print]. DOI: 10.1111/jdv.16069. *JIF* (2018): 5,1

Originalarbeiten als Ko-Autor

1. Kresken J, Kindl U, Wigger-Alberti W, **Clanner-Engelshofen BM**, Reinholz M. Dermocosmetics for Use in Rosacea: Guideline of the Society for Dermopharmacy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31(3):147-154. *JIF* (2018): 1,9
2. Aoki R, **Clanner-Engelshofen BM**, Charnowski S, Ruzicka T, Reinholz M. Distribution of high-risk α -genus human papillomavirus genotypes impacts cutaneous neoplasms. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Jul;33(7):1304-1311. *JIF* (2018): 5,1
3. Hildebrand JA, Fischbeck AJ, Hundsdoerfer B, **Clanner-Engelshofen BM**, Marsela E, Wollenberg A, Flaig M, French LE, Reinholz M. Retrospective Analysis of alpha Human Papillomavirus (HPV) Types in Tissue Samples from Anogenital Dysplasias - Introduction of the RICH (Risk of HPV-related Carcinoma in HIV[±] patients) Score. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 [epub ahead of print]. DOI: 10.1111/jdv.15932. *JIF* (2018): 5,1
4. Hoepfner A, Marsela E, **Clanner-Engelshofen BM**, Horvath ON, Sardy M, French LE, Reinholz M. Rosacea and perioral dermatitis: a single-center retrospective analysis of the clinical presentations of 1032 patients. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2019 [akzeptiert]. *JIF* (2018): 3,9
5. Alharbi R, **Clanner-Engelshofen BM**, Hildebrand JA, Schinabeck-Kühne N, Niculescu L, French, LE, Kaudewitz P, Reinholz M. Diode lasers in the treatment of genital warts. *Eur J Dermatol*. 201;29(4):409-416. *JIF* (2018): 3,1

Fallberichte

1. Alharbi R*, **Clanner-Engelshofen BM***, Maertz J, Ruzicka T, Reinholz M. Ocular Rosacea Successfully Treated with Topical Ivermectin. *J Clin Case Rep*. 2017;7:9. *JIF* (2017): 1,5
*contributed equally
2. **Clanner-Engelshofen BM**, Schwaiger H, Plewig G, Wolff H, Ruzicka T and Reinholz M. Systemic Steroids, Clarithromycin and Metronidazole in the Treatment of Rosacea during Pregnancy. *J Clin Case Rep*. 2018; 8:4. *JIF* (2018): 1,5
3. Reinholz M, **Clanner-Engelshofen BM**, Heppt MV, Hirai Y, Ruzicka T, Berking C, von Braunmühl T. Successful Treatment of Genital Warts with Ingenol Mebutate Monitored with Optical Coherence Tomography and Reflectance Confocal Microscopy. *Ann Dermatol*. 2019;31(4):434-437. *JIF* (2018): 1,6

Poster

1. Jøntvedt NM*, **Clanner-Engelshofen BM***, Witzleb AJ, Schwaiger H, Feldner BJ, Cappello C, Sager A, French LE, Reinholz M. Anti-Aging-Effekt einer Anti-Rötungen-Gesichtspflegeserie bei Patienten mit Erythem, Couperose und Rosazea Subtyp I. 49. DDG-Tagung 2017.
*contributed equally

1. Einleitung

1.1. *Geschichte*

Die Entdeckung der menschlichen Haarbalgmilbe gelang dokumentiert erstmals 1841 dem Franzosen M. Berger im Cerumen des äußeren Gehörgangs, der jedoch seine Ergebnisse erst vier Jahre später in der Akademie der Wissenschaften in Paris veröffentlichte (Berger 1845). Er ordnete die Milbe systematisch fälschlicherweise dem Stamm der Tardigrada (Bärtierchen) zu.

Der deutsche Pathologe und Anatom F. Henle beschrieb kurze Zeit später bei seinen Untersuchungen der Drüsen des Gehörgangs ebenfalls einen in den Drüsengängen vorkommenden „Wurm“, den er als Parasiten einordnete, sich jedoch bezüglich der Systematik nicht sicher war (Henle 1841). Er regte ebenso den Physiologen J. Miescher dazu an die Milbe zu erforschen (Miescher 1843).

Der deutsche Dermatohistopathologe G. Simon ordnete 1842 das Tier erstmals richtig als Milbe ein (Simon 1842a). In einer zweiten Veröffentlichung im gleichen Jahr beschrieb er die Spezies detailliert (Simon 1842b), unterschied jedoch nicht zwischen zwei morphologisch unterschiedlichen Formen mit rundem und spitzem Schwanzende und unterschiedlicher Körperlänge.

Im Jahr 1843 wurde durch den Biologen R. Owen der bis heute übliche systematische Name *Demodex folliculorum* eingeführt (Owen 1843).

Ein Jahr später berichtete Tulk über ähnliche Milben in der Haut des Hundes (Tulk 1844). Zahlreiche weitere Wissenschaftler befassten sich mit der Milbe, förderten jedoch nur wenig Neues zutage (Gmeiner 1908).

Über 120 Jahre nach der Erstbeschreibung erkannte L. Akbulatova das Vorliegen zweier distinkter Subspezies und schlug die Namen *Demodex folliculorum longus et brevis* vor, wobei ihr zu Ehren jedoch die neu entdeckte Subspezies *Demodex brevis* (AKBULATOVA) genannt wurde (Akbulatova 1963). C. Desch und W. Nutting beschrieben detailliert die Unterschiede von *Demodex folliculorum* (SIMON) und *Demodex brevis* (AKBULATOVA) (Desch and Nutting 1972).

1.2. *Natürliches Vorkommen und Phylogenie*

Demodex folliculorum und *Demodex brevis* können nicht nur morphologisch anhand von Körperlänge und Schwanzende (unzureichend) unterschieden werden, sondern besiedeln auch unterschiedliche ökologische Nischen der Haartaldrüseneinheit – während *Demodex folliculorum* den Haarfollikelschaft nahe der Hautoberfläche besiedelt, sind *Demodex brevis* Milben am Eingang zur oder in der Talgdrüse zu finden (Desch and Nutting 1972). Es ist anzunehmen, dass ihre kleinere, gedrungenere Morphologie das tiefere Eindringen erleichtert.

Obwohl die humanen Demodex-Milben meist nur Vellus-Haartaldrüseneinheiten besiedeln und damit auf makroskopisch haarloser Haut vorkommen, besiedeln Demodex-Milben anderer Säugetierarten auch vollständig mit Terminalhaar bedeckte Bereiche.

Einleitung

Hierbei zeigt sich eine ausgeprägte Wirtsspezifität, wobei fast jede bislang beschriebene Säugetierart zwei oder mehr Milbenspezies auf sich vereint (analog zu *D. folliculorum et brevis* beim Menschen).

Über 140 verschiedene Demodex-Spezies sind bislang bekannt, unter anderem auf Wirten wie Hund, Katze, Meerschweinchen, Hase, Hamster, Maus, Ratte, Frettchen, Dachs, Igel, Schaf, Ziege, Rind, Schwein, Hirsch, Krallenaffen, Fledermaus, Koala, Waschbär, Bär, Panda, Lama, Löwe, Tiger, Gürteltier, Büffel, Antilope und Seelöwe (Desch 2009; Ferrer et al. 2014).

Es gibt nur vereinzelt Berichte über eine Demodex-Besiedlung von Fehlwirten, beispielsweise von *Demodex canis* (Demodexmilbe des Hundes) bei einem Frettchen (Zewe et al. 2017).

Die weite Verbreitung der Milben im Tierreich lässt eine sehr frühe Besiedlung der ersten behaarten Tiere schließen. Amnioten (Nabeltiere), die Vorfahren von Vögeln, Reptilien und Säugetieren, entwickelten sich vor etwa 300 Millionen Jahren und mussten sich zum Schutz vor Wasserverlust an Land anpassen. Hierzu entwickelten sie das Stratum corneum (Hornschicht) der Epidermis.

Im weiteren Verlauf entwickelten die Sauropsiden, Vorläufer von Vögeln und Reptilien, eine α -keratinisierte Schicht über der β -Keratinschicht, aus der Federn und Schuppen hervorgingen. Die Theropsiden, Vorläufer der Säugetiere, entwickelten Protohaare, welche einerseits die mechanische Belastbarkeit der Haut erhöhten, andererseits eine verbesserte Thermoregulation ermöglichten.

Die ersten Haare entwickelten Säugetiere vor etwa 210 Millionen Jahren. Der geringe molekulargenetische Unterschied verschiedener Demodex-Spezies lässt Rückschlüsse zu, dass die erste Besiedlung von Säugetieren mit Demodex-Milben bzw. deren Vorläufern bereits vor 100 bis 200 Millionen Jahren stattfand (Ferrer et al. 2014).

Diese sehr lange Mikroben-Wirt-Beziehung erklärt auch die Tatsache, weshalb *Demodex folliculorum* näher auf genetischer Ebene mit *Demodex canis* verwandt ist als mit *Demodex brevis* (Hu et al. 2019; Sastre et al. 2016).

1.3. Anatomie

1.3.1. Entwicklung

Der Lebenszyklus der Demodex-Milbe wurde detailliert von Spickett beschrieben, indem er die einzelnen Stadien und die Zeit bis zur Häutung dokumentierte. Die Milben kopulieren am Eingang der Hautpore, woraufhin sich die schwangere, weibliche Milbe in die Haartalgdrüseneinheit begibt und nach etwa 12 Stunden ein Ei legt. 60 Stunden nach Eiablage schlüpft die sechsbeinige Larve und häutet sich nach 36 Stunden zur sechsbeinigen Protonymphe. Larve und Protonymphe bewegen sich nur wenig aktiv und werden mit dem Fluss des Sebums in Richtung Porenausgang befördert. Nach 72 Stunden häutet sich die Protonymphe zur achtbeinigen Deutonymphe. Diese bewegt sich möglicherweise bereits aktiv über die Hautoberfläche zu weiteren Poren und besiedelt diese. Im Follikel häutet sie sich nach 60 Stunden zum adulten Tier. Die weiblichen Tiere verweilen im Poreneingang zur Kopulation, wohingegen männliche Tiere vermutlich auch aktiv über die Hautoberfläche weitere Poren besiedeln. Nach der Eiablage tief im Follikel wandert das weibliche Tier wieder zum Poreneingang für weitere Kopulationsakte, wobei die Gesamtlebensdauer des adulten Tieres auf 120 Stunden geschätzt wird. Die gesamte Lebensdauer beträgt somit etwa 348 Stunden bzw. 14,5 Tage (Spickett 1961b).

Eine Veröffentlichung aus dem gleichen Jahr beschrieb bei der Demodex-Milbe des Hamsters ein *in vitro* Überleben von 51 Tagen (Nutting and Rauch 1961).

Beide humanen Demodex-Spezies verfügen über drei Körperabschnitte: Gnathosoma (Nahrungsaufnahme und Sensorik), Podosoma (Fortbewegung und Fortpflanzung) und Opisthosoma (Nervensystem, Verdauung und Speicherfunktion) (Desch and Nutting 1977). Ein aktives Herz-Kreislauf-System oder Organe für die Atmung existieren nicht (Desch 1973).

Demodex folliculorum ist länger als *Demodex brevis* (längste Exemplare 436 μm vs. 251 μm) und hat ein abgerundetes, *D. brevis* ein spitzes Schwanzende (Desch and Nutting 1972).

1.3.2. Gnathosoma

Das Gnathosoma (gr. gnathos „Kiefer“ und soma „Körper“) bildet den kaudalen Körperabschnitt und dient der Nahrungsaufnahme und der Sensorik. Die Mundwerkzeuge der Milben werden Cheliceren (Kieferfühler) genannt und kommen bei allen Chelicerata (Kieferklauträger) vor. Die paarigen, stilett-artigen Cheliceren sitzen in einer irregulär geformten präoralen Kavität. Sie können zur Nahrungsaufnahme durch eine schlitzzartige Öffnung ausgefahren werden um Zellen zu punktieren und deren Inhalt auszusaugen. Lateral liegende Pedipalpen (lat. pes „Fuß“ und palpus „Taster“) dienen zum Bewegen der Nahrung und sind reichlich mit Sinneszellen zum Fühlen, Riechen und Schmecken ausgestattet.

Paarige Speicheldrüsen münden in die präorale Kavität und ermöglichen den Verdau. Die Speicheldrüsen selbst liegen weiter kaudal im Podosoma. Der Saugvorgang wird durch Muskelkontraktion des Pharynx-Bulbus ermöglicht, welcher mikroskopisch als hufeisenförmige Struktur erkennbar ist. Er befördert die Nahrung weiter in den 1 μm weiten Ösophagus, der durch das Podosoma verläuft, das Synganglion durchdringt und in den Verdauungstrakt des Opisthosomas mündet (Desch 1989; Desch and Nutting 1972).

1.3.3. Podosoma

Das Podosoma (gr. pous „Fuß“ und soma „Körper“) ist mit vier seitlichen Fußpaaren besetzt, die ventral von den Epimeralplatten gestützt werden. Durch ein chitinöses Exoskelett besitzen sowohl Gnathosoma als auch Podosoma eine größere Festigkeit als das eher elastische Opisthosoma. Die Füße sind mehrgliedrig und werden von verschiedenen Autoren als drei- bis fünfgliedrig beschrieben. Sie sind distal mit Klauen besetzt.

Weibliche Tiere haben zwischen/hinter den 4. Epimeralplatten ventral eine schlitzzförmige Öffnung, die Vulva. Männliche Tiere besitzen dorso-anterior eine Öffnung, durch die der halbkreisförmige Aedaegus (Penis) protrahiert werden kann.

Kommt es zur Kopulation, müssen sich die Tiere also dorso-ventral zueinander positionieren, um den Geschlechtsakt zu ermöglichen (Desch and Nutting 1972; Gmeiner 1908; Hirst 1919; Stromberg and Nutting 1972).

1.3.4. Opisthosoma

Das Opisthosoma (gr. opiso „hinten“ und soma „Körper“) stellt den kaudalen Körperabschnitt dar. Am Übergang von Podosoma zu Opisthosoma liegt das Synganglion, das zentrale Nervensystem der Milben. Es ist meist schon lichtmikroskopisch zu erkennen und hat oft eine charakteristisch herzförmige Gestalt. Der Ösophagus verläuft durch das Synganglion.

Einleitung

Fluoreszenzmikroskopisch stellt sich bei DAPI-gefärbten Milben das Synganglion sehr zellkernreich dar, wurde aber in der Literatur fälschlicherweise als befruchtete Eizellen gedeutet, vermutlich wegen der räumlichen Nähe zur Vulva (Jahns and Alexeyev 2012).

Der Uterus verläuft von der Vulva nach dorso-posterior, was vor allem bei schwangeren Tieren durch die Lage des Eis gut beobachtet werden kann. Bei nicht schwangeren Tieren ist der Uterus lichtmikroskopisch nicht zu erkennen.

Der Verdauungstrakt wurde in elektronenmikroskopischen Studien beschrieben. Der Ösophagus mündet im kranialen Opisthosoma, wo die vorverdaute Nahrung durch Typ I Zellen resorbiert wird. In den hinteren zwei Dritteln des Opisthosomas finden sich Typ II Zellen, welche viele zytoplasmatische Lipidtröpfchen beinhalten und kaudal sehr mitochondrienreich sind.

Neben den kleineren, kettenartig angeordneten Lipidtröpfchen finden sich größere, kugelförmige Kompartimente, die den Turgor der Milbe aufrechterhalten. Daneben sind „Pigment-Granula“ beschrieben, die mutmaßlich die Ablagerung von stickstoffhaltigen Stoffwechselendprodukten darstellen (im Sinne eines Kristallisationskeims). Diese Annahme begründet sich vermutlich auf der Tatsache, dass die Milben keinen Anus besitzen und somit keine Stoffwechselendprodukte ausscheiden können.

Zwar findet sich ventral-posterior eine Öffnung, welche als „opisthosomal organ“ bezeichnet wird, diese endet jedoch nach wenigen Mikrometern blind und ist bei *Demodex brevis* nicht angelegt, weshalb ihr keine praktische Funktion beigemessen wird (Desch 1989; Desch and Nutting 1972, 1972; Hirst 1919; Nutting 1976a; Pajarre and Peura 1977; Stromberg and Nutting 1972).

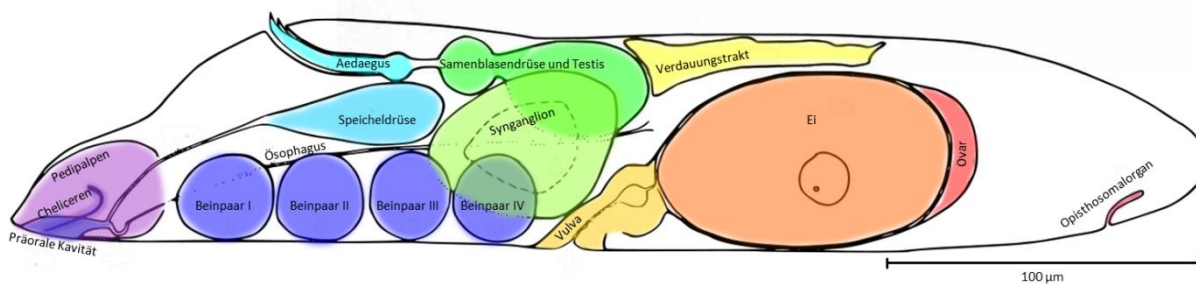


Abbildung 1: Übersicht der anatomischen Verhältnisse der Demodex-Milbe (modifiziert nach (Nutting et al. 1979))

1.4. Endobakterien

Mehrere bakterielle Spezies wurden als Endosymbiont der Demodex-Milbe vorgeschlagen. Schon 1961 hat Spickett im Verdauungstrakt der Milben säurefeste Bakterien nachgewiesen und äußerte die Vermutung, dass *Demodex* spp. ein Vektor für Lepra sein könnte (Spickett 1961a).

Lacey et al. isolierten 2007 das Bakterium *Bacillus oleronius* aus den Milben, wobei jedoch die Methodik nur unzureichend beschrieben und keine Technik zur Dekontamination des Milbenäußeren erwähnt wurde (Lacey et al. 2007).

Wie auf allen Grenzflächen beschreibt die Literatur auch beim Chitin-Exoskelett der Milbe, dass Bakterien hier sehr fest adherieren können, was eine äußerliche Dekontamination unerlässlich erscheinen lässt (Nutting 1976b).

Auch weitere *Bacillus*-Spezies sind in der Literatur beschrieben Demodex-assoziiert zu sein. Tatu et al. isolierte einen *Bacillus simplex* Stamm aus Demodex-Milben (Tatu et al. 2016a), im selben Jahr mit derselben Methodik auch einen *Bacillus cereus* Stamm (Tatu et al. 2016b). Im Jahr danach beschrieben sie wiederum einen *Bacillus pumilus* Stamm (Tatu et al. 2017). Allerdings finden sich *Bacillus* spp. Bakterien ubiquitär in der Umwelt und die obigen Ergebnisse wurden bislang nicht reproduziert.

1.5. Potenzielle Humanpathogenität und assoziierte Krankheiten

1.5.1. Extraktionsverfahren

Um Demodex-Milben zu sammeln haben sich verschiedene Methoden etabliert, wie das Ausdrücken von Poren per Hand, mittels eines Komedonenextraktors, mittels Klebeband, die „skin surface biopsy method“ von Marks und Dawber (Marks and Dawber 1971) und die „improved standardized skin surface biopsy method“ (Lacey et al. 2016).

Hierdurch gewinnt man milbenhaltiges Sebum und Talg, alle weiteren Schritte erfordern die mikroskopische Inspektion der Probe. Dadurch lassen sich dann einzelne Milben händisch mithilfe von Nadeln, fein ausgezogenen Glaskapillaren, feinen Skalpellen oder speziellen Instrumenten (z.B. der Moria Feinpinzette, FST, Deutschland) isolieren.

Die Technik kann optimiert werden, jedoch benötigen auch geübte Wissenschaftler hierbei 2 bis 5 Minuten pro einzelne Milbe (eigene Beobachtungen), was die wissenschaftliche Untersuchung einer größeren Anzahl von Milben extrem erschwert.

1.5.2. Primäre Demodikosen

Eine primäre Demodikose besteht, sofern keine vorbestehenden oder zeitgleich auftretenden entzündlichen Hautkrankheiten, wie Akne, Rosazea oder periorale Dermatitis, vorliegen, die Anzahl an Demodex-Milben auf der erkrankten Haut erhöht ist (> 5 Milben/cm²) und sich die Erkrankung mit Akariziden zufriedenstellend therapieren lässt.

Einleitung

Klinisch treten primäre Demodikosen meist nach dem 40. Lebensjahr auf, betreffen das Gesicht (meist perioral, periorbital und periaurikulär), sind gruppiert und asymmetrisch verteilt mit Satellitenläsionen und sind eher asymptomatisch bzw. jucken nur leicht (im Gegensatz zu Rosazea mit Überwärmung, Flushing und Missempfindungen).

Es lassen sich drei Formen der primären Demodikose unterscheiden: Pityriasis folliculorum, rosazea-ähnliche (rosaceiforme) bzw. periorale/periorbitale/periaurikuläre dermatitis-ähnliche Demodikose und granulomatöse bzw. nodulozystische Demodikose.

Sonderformen bezüglich der Lokalisation stellen die okuläre und aurikuläre Demodikose dar (Chen and Plewig 2014).

1.5.2.1. Pityriasis folliculorum

Pityriasis folliculorum äußert sich in feinen, weißlichen, spitzen Veränderungen der Haarfollikel des Gesichts, die isoliert, aber in Gruppen auftreten. Es können umgebend eine leichte Entzündung, Rötung und Brennen auftreten. Die tastbaren spitzen Follikelveränderungen sind möglicherweise die kaudalen Opisthosomata der Milben, die aus den Poren herausragen (Ayres 1930; Chen and Plewig 2014).

1.5.2.2. Rosazea-ähnliche Demodikose

Papulopustulöse Hautveränderungen des Gesichts, ohne Vorbestehen von inflammatorischen Dermatosen, sprechen für eine rosazea-ähnliche Demodikose. Sie können je nach betroffenem Areal noch weiter unterteilt werden: Prädilektionsstellen sind perioral, periorbital und periaurikulär, wobei sie auch nur einseitig auftreten können (Chen and Plewig 2014).

1.5.2.3. Granulomatöse Demodikose

Treten Granulome, Abszesse, Knoten oder Zysten auf, handelt es sich um eine granulomatöse bzw. nodulozystische Demodikose. Wie auch bei Acne conglobata besteht hierbei das Risiko von bleibender Narbenbildung. Es handelt sich um eine schwere Entzündungsreaktion mit inflammatorischen (peri)follikulären Infiltraten und Eiteransammlung (Chen and Plewig 2014).

1.5.3. Sekundäre Demodikosen

Treten Hautläsionen durch Demodex-Milben infolge einer anderen Erkrankung oder Immunsuppression auf, handelt es sich *per definitionem* um eine sekundäre Demodikose. Meist kommen diese bei Patienten mit schwer geschädigtem Immunsystem (HIV, Leukämie) oder Patienten mit immunsuppressiver Medikation (Glukokortikoide, DMARDs, Calcineurininhibitoren) auf.

Auch einige inflammatorische Dermatosen (periorale Dermatitis, papulopustuläre Rosazea, seborrhoische Dermatitis, Steroid-Dermatitis), therapeutische Maßnahmen (Therapie mit EGFR-Inhibitoren, UV-Phototherapie), Hauttumoren (melanozytische Naevi, Basalzellkarzinom des Augenlids, Mycosis fungoides) und chronisches Nierenversagen können zu sekundären Demodikosen führen.

Im Gegensatz zu den primären Demodikosen können sekundäre bereits früher im Leben auftreten, zeigen eine diffusere Verteilung, die auch den Körperstamm betreffen kann, und gehen mit ausgeprägteren Entzündungszeichen einher (Chen and Plewig 2014).

1.5.4. Therapeutische Ansätze

Zur Therapie der Demodikose gibt es keine zugelassenen Humanarzneimittel, daher erfolgt die Behandlung immer off-label. Meist werden hierzu Wirkstoffe gegen Ektoparasitosen, wie die

Krätze (ausgelöst durch die Scabies-Milbe *Sarcoptes scabiei*) oder Kopf- bzw. Filzläuse (*Pediculus humanis capitis/corporis* bzw. *Pthirus pubis*) eingesetzt.

Als selektives Akarizid ist Ivermectin (aus der Gruppe der Avermectine) in der Regel Mittel der ersten Wahl und wird als Einmalgabe gewichtsadaptiert verabreicht. Es kann ebenso topisch zur Anwendung kommen.

Weitere topische Arzneimittel zur Behandlung der Demodikose sind Permethrin (Pyrethroide), Malathion (Thiophosphorsäureester), Lindan (polychlorierte Kohlenwasserstoffe), Benzylbenzoat und Crothamiton (mit dualer, juckreizlindernder Wirkung). Ebenso werden versuchsweise Rosazea-Präparate mit anti-inflammatorischer und/oder antibiotischer Wirkung (auf den bakteriellen Endosymbionten) angewendet, wie Doxycyclin (Tetracycline), Clarithromycin (Makrolide), Metronidazol (Nitroimidazole), Azelainsäure (Dicarbonsäuren). Moxidectin (Milbemycine), das erst seit Mitte 2018 zur Anwendung am Menschen in den USA zugelassen ist, könnte ebenfalls zur Anwendung kommen, da es bereits für die canine Demodikose zugelassen ist (Chen and Plewig 2014).

Neben verschiedenen Avermectinen, Pyrethroiden, Thiophosphorsäureestern, werden bei der veterinärmedizinischen Behandlung von Demodikosen vor allem Isoxazoline, wie Afoxolaner, Fluralaner, eingesetzt. Daneben existieren weitere Wirkstoffe aus den Gruppen der Amidine (Amitraz), Phenylpyrazole (Fipronil) und Carbamate (Propoxur) (Fourie et al. 2013; Lebon et al. 2018; Mount et al. 1975; Mueller et al. 2012; Perego et al. 2019).

2. Veröffentlichung I

2.1. Fragestellung und Zielsetzung

In der Veröffentlichung „Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp.“ wird das grundlegende Problem angegangen, dass man aufgrund eines fehlenden Herz-Kreislauf-Systems sowie fehlender aktiver Atmung zur Beurteilung der Viabilität der untersuchten Milben stets darauf angewiesen ist die Bewegung einzelner Gliedmaßen abzuwarten. Ebenso können Milben bis dato nicht in größerer Anzahl präpariert werden, um sie beispielsweise in Experimenten einzusetzen. Sie müssen sequenziell von Hand einzeln isoliert und präpariert werden, was einen sehr zeitaufwändigen Prozess darstellt (Desch 1973; Lacey et al. 2016).

2.2. Methodik

Die Milben wurden aus Hauttalg-Proben und Hautabschabungen der Diagnostik-Abteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen. Die Nutzung dieser anonymisierten Proben, die bereits die Diagnostik durchliefen, wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt (Projekt 17-450 UE). Die Proben wurden feucht gelagert und noch am selben Tag der Entnahme verwendet. Es wurde nicht zwischen den Subspezies *D. folliculorum* und *D. brevis* unterschieden.

Die Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie wurde mittels eines invertierten Axio Observer 7 Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt und mit der ZEN Imaging Software (Zeiss) dokumentiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden blaue (DAPI, Filterset 02 und 49, Zeiss), grüne (GFP, Filterset 38, Zeiss) und rote (PI, Filterset 43, Zeiss) Filter verwendet. Die Milben wurden nativ und fluoreszenzgefärbt (Propidiumiodid) untersucht.

In der Veröffentlichung wurde zur Batch-Isolation größerer Milbenanzahlen eine Sucrose-Gradientenzentrifugation durchgeführt, wobei das Sebum zuerst in Natriumdodecylsulfat mit 10% Ethanol resuspendiert und anschließend vorsichtig auf ein Sucrosegradienten-Röhrchen mit 32, 16, 8, 4 und 2% Sucroslösung pipettiert wurde. Nach der Zentrifugation wurde die Milben-enthaltende Phase (zwischen 4 und 8%) abpipettiert und über einen Transwell-Einsatz filtriert.

Die so gewonnenen Milben wurden daraufhin in L-15 Medium inkubiert und einmal täglich für 30 Minuten mit einer Propidiumiodidlösung (5 µg/ml in L-15 Medium) gefärbt, um ihre Viabilität zu beurteilen. Hierbei fluoreszieren die podosomalen Zellkerne toter Milben intensiv rot unter UV-Illumination. Die Viabilität wurde zusätzlich über die Bewegung der Beine und Cheliceren beurteilt.

2.3. Ergebnisse und Diskussion

Durch die Gradientenzentrifugation einer durch Tensid und Ethanol aufgeschlossenen Sebumprobe lassen sich rasch große Mengen von Milben mit wenigen Kontaminationen, wie

Hautzellen und Sebumreste, gewinnen. Hierbei wurden bis zu 320 Tiere aus 5,2 mg Sebum gewonnen. Die Milben wurden durch die Methode nicht oder nur wenig negativ beeinflusst, sodass das Verfahren der konventionellen manuellen Extraktion überlegen ist, sofern viele Tiere benötigt werden.

Die Viabilitätsanalyse mittels Propidiumiodid erlaubt zudem erstmals die rasche Beurteilung großer Zahlen von Tieren, ohne dass hierfür auf die Bewegung eines jeden Tieres gewartet werden muss. Die gewonnenen Kaplan-Meier-Plots zeigten, dass die neue Methodik mittels Avital-Färbung keine negative Auswirkung auf die Milben hat.

Die Etablierung dieser Methoden erlaubt der Wissenschaft erstmals größere Screening-Untersuchungen, beispielsweise der Toxizität von Akariziden, durchzuführen und die Milben dabei im Batch-Verfahren zu isolieren und potenziell sogar automatisiert hinsichtlich ihrer Viabilität zu analysieren.

2.4. Arbeitsanteil

Die Veröffentlichung wurde von mir, Benjamin Clanner-Engelshofen, konzipiert, designt und experimentell durchgeführt, ebenso wurden die gewonnenen Daten von mir analysiert und interpretiert. Das Manuskript wurde in seiner ersten Fassung von mir geschrieben, nach Vorschlägen der Ko-Autoren revidiert und zur Publikation eingereicht.

Die Ko-Autoren Prof. Dr. Dr. Thomas Ruzicka und PD Dr. Markus Reinholz haben zur Durchführung der Experimente beraten und Hilfestellung gewährt, das Manuskript kritisch revidiert und die wissenschaftliche Infrastruktur bereitgestellt.

Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp.

Veröffentlicht in:

Clanner-Engelshofen BM, Ruzicka T, Reinholz M: Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp. Exp Appl Acarol. 2018 Sep;76(1):71-80.

DOI: 10.1007/s10493-018-0289-0

3. Veröffentlichung II

3.1. Fragestellung und Zielsetzung

In der Veröffentlichung „*Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*“ wird die Demodex-Milbe auf Endobakterien untersucht. Hierzu finden sich mehrere Publikationen in der Literatur, jedoch wurde in keiner hiervon die Milbe äußerlich desinfiziert und zudem war die Isolierung der Bakterien nicht reproduzierbar (Lacey et al. 2007; Tatu et al. 2016b; Tatu et al. 2016a; Tatu et al. 2017). Die Lokalisation der Bakterien und deren phänotypische und molekularbiologische Eigenschaften werden detailliert untersucht und mit dem zugehörigen Referenzstamm *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM 44385 verglichen.

3.2. Methodik

Die Milben wurden aus Hauttalg-Proben und Hautabschabungen der Diagnostik-Abteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen. Die Nutzung dieser anonymisierten Proben, die bereits die Diagnostik durchliefen, wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt (Projekt 17-450 UE). Die Proben wurden feucht gelagert und noch am selben Tag der Entnahme verwendet. In dieser Veröffentlichung wurde nur mit *D. folliculorum* gearbeitet.

Die Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie wurde mittels eines invertierten Axio Observer 7 Mikroskops (Carl Zeiss AG, Deutschland) durchgeführt und mit der ZEN Imaging Software (Zeiss) dokumentiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden blaue (DAPI, Filterset 02 und 49, Zeiss), grüne (GFP, Filterset 38, Zeiss) und rote (PI, Filterset 43, Zeiss) Filter verwendet. Die Milben wurden nativ und fluoreszenzgefärbt (Resazurin) untersucht.

In Veröffentlichung wurden die Endobakterien der *D. folliculorum* Milbe isoliert, wobei diese zuvor einzeln mechanisch und durch Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid äußerlich dekontaminiert wurden. Hierzu wurden adulte Tiere und sich häutende Nymphen verwendet, welche Bakterien in ihr altes Exoskelett abgeben. Die ersten Isolate wurden grob auf Gattungsebene über 16S-Sequenzierung und MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt, woraufhin das Kulturmedium optimiert wurde und die erneut isolierten Bakterien erfolgreich angezüchtet werden konnten. Die so gewonnenen Bakterien wurden mittels *rpoB*-Sequenzierung (zur spezifischeren Feststellung der Spezies in der Familie der *Corynebacteriaceae*), *nanI*-Amplifizierung (*C. kroppenstedtii* DSM 44385 spezifisches Gen), ERIC-/REP-PCR (Vergleich der Genomarchitektur), DNA-DNA-Hybridisierung (direkter Vergleich der Sequenzidentität der beiden bakteriellen Genome), GC-Anteil-Bestimmung des Genoms, Analyse der Mykolsäure- und Fettsäurezusammensetzung, Phänotypanalyse (Bestimmung metabolischer Eigenschaften, wie Substratverstoffwechslung und Enzymausstattung) und Antibiotika-Resistenztestung mit dem Referenzstamm verglichen.

3.3. Ergebnisse und Diskussion

Die Identifikation und Charakterisierung des bakteriellen Endosymbioten der humanen *D. folliculorum* Milbe resultierte in der Beschreibung einer neuen Subspezies des Referenzstammes *C. kroppenstedtii* DSM 44385.

Die Einordnung als Subspezies erfolgte hierbei anhand der Konvention, dass für eine neue Spezies die DNA-DNA-Hybridisierung unter 70% liegen muss (Wayne et al. 1987). Mit 78% Genomähnlichkeit wird dieser Wert nicht unterschritten, allerdings unterscheidet sich das neue Isolat teils massiv vom Referenzstamm, wie beispielsweise in der Genomarchitektur der repetitiven Sequenzen (ERIC-/REP-PCR), dem Vorhandensein von Mykolsäuren in der Zellwand, der Enzymsausstattung und dem Stoffwechsel.

Die Identifikation der neuen Subspezies wird es in Zukunft erlauben die komplexe, dreiteilige Wirt-Mikroben-Beziehung zwischen Mensch, Milbe und Endobakterium genauer zu untersuchen und potenziell weitere therapeutische Targets offenbaren.

3.4. Arbeitsanteil

Die Veröffentlichung wurde von mir, Benjamin Clanner-Engelshofen, konzipiert, designt und experimentell durchgeführt, ebenso wurden die gewonnenen Daten von mir analysiert und interpretiert. Das Manuskript wurde in seiner ersten Fassung von mir geschrieben, nach Vorschlägen der Ko-Autoren revidiert und zur Publikation eingereicht.

Die Ko-Autoren Prof. Dr. Lars French und PD Dr. Markus Reinholz haben zur Durchführung der Experimente beraten und Hilfestellung gewährt, das Manuskript kritisch revidiert und die wissenschaftliche Infrastruktur bereitgestellt.

Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum

Veröffentlicht in:

Clanner-Engelshofen BM, French LE, Reinholz M: *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2019 Nov; [epub ahead of print].

DOI: 10.1111/jdv.16069

4. Ausblick

In der vorliegenden kumulativen Dissertation sollten die Techniken im wissenschaftlichen Umgang mit der Demodex-Milbe und das Wissen zu ihrer Biologie, Physiologie und Anatomie weiterentwickelt werden.

Das seit über 170 Jahren zunehmend, insgesamt jedoch nur wenig grundlagenwissenschaftlich beforschte Feld der humanen Demodexmilben wird hierdurch ausgeweitet.

Durch die Etablierung neuer Methoden und tieferer, grundlegender Zusammenhänge kann somit weiter in die Breite geforscht werden, was ultimativ auch den krankheitsrelevanten Aspekten der Hautbesiedelung mit dem komplexesten Kommensalen des Menschen, *Demodex* spp., zugutekommen wird.

5. Zusammenfassung

Deutsch

Die Entdeckung der humanen Demodex-Milbe liegt bereits 178 Jahre zurück und noch immer gibt es zahlreiche offene Fragen zum komplexesten Kommensalen des Menschen. Die Erstbeschreibung gelang M. Berger (Berger 1845), G. Simon ordnete die Milbe systematisch richtig ein (Simon 1842a, 1842b) und R. Owen erschuf die bis heute übliche Bezeichnung *Demodex folliculorum* (Owen 1843), wobei L. Akbulatova die zweite humane Demodex-Spezies beschrieb, *D. brevis* (Akbulatova 1963).

Die Haartalldrüseneinheit-besiedelnden Milben zeigen eine ausgeprägte Wirtsspezifität und kommen auch bei zahlreichen weiteren Säugetierarten vor (Desch 2009; Ferrer et al. 2014), die evolutionäre Symbiose besteht molekulargenetischen Untersuchungen zufolge schon seit 100-200 Millionen Jahren (Ferrer et al. 2014).

Die Milbe vollzieht ihren gesamten Lebenszyklus (Ei, Larve, Protonympe, Deutonympe, adultes Tier) auf und in der menschlichen Haut, wobei sie etwa zwei Wochen lebt (Spickett 1961b).

Der Körper lässt sich grob in drei Teile untergliedern: Gnathosoma (Nahrungsaufnahme und Sensorik), Podosoma (Fortbewegung und Fortpflanzung) und Opisthosoma (Nervensystem, Verdauung und Speicherfunktion) (Desch and Nutting 1977). Mehrere vermeintliche Endobakterien wurden isoliert und beschrieben, jedoch wurde keines der Ergebnisse reproduziert (Lacey et al. 2007; Tatu et al. 2016b; Tatu et al. 2016a; Tatu et al. 2017).

Zur wissenschaftlichen und klinischen Untersuchung gibt es mehrere zeitaufwändige, jedoch nicht zufriedenstellende Extraktionsmethoden (Lacey et al. 2016; Marks and Dawber 1971). Klinisch kann die Milbe zu primären (Pityriasis folliculorum, rosazea-ähnliche und granulomatöse Demodikose) und zu sekundären Demodikosen (bei Immunsuppression und anderen Vorerkrankungen) führen, die meist mit Ivermectin, aber auch anderen Akariziden, therapiert werden (Chen and Plewig 2014).

In der ersten Veröffentlichung „Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp.“ werden Methoden zur raschen Isolation großer Milbenanzahlen mittels Sucrose-Gradientenzentrifugation und zur Viabilitätsanalyse mittels Propidiumiodid-Avitalfärbung beschrieben (Clanner-Engelshofen et al. 2018).

Es konnte mithilfe von Kaplan-Meier-Plots gezeigt werden, dass die Färbung das Überleben der Milben nicht negativ beeinflusst. Mittels dieser Techniken lassen sich für die zukünftige Forschung schnell große Mengen der Tiere gewinnen und einfach hinsichtlich der Viabilität untersuchen.

In der zweiten Veröffentlichung „*Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*“ wurde das Endobakterium der Demodexmilbe reproduzierbar isoliert und charakterisiert (Clanner-Engelshofen et al. 2019).

Dazu wurden seine phänotypischen und molekularbiologischen Eigenschaften detailliert untersucht und mit dem zugehörigen Referenzstamm *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM 44385 verglichen.

Zusammenfassung

Es hat sich gezeigt, dass die neue Subspezies *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* sich in zahlreichen Eigenschaften unterscheidet, wie beispielsweise in der Genomarchitektur der repetitiven Sequenzen (ERIC-/REP-PCR), dem Vorhandensein von Mykolsäuren in der Zellwand, der Enzymausstattung und dem Stoffwechsel.

Die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zum besseren Verständnis der Biologie, Physiologie und Anatomie der komplexesten humanen Kommensalen, *Demodex* spp., beitragen und die weitere Forschung auf diesem Gebiet fördern.

Ebenso werden sie in Zukunft erlauben die dreiteilige Wirt-Mikroben-Beziehung genauer zu untersuchen und möglicherweise neue und optimierte Therapieoptionen eröffnen.

English

The discovery of human Demodex-mites dates back 178 years ago and still there are many open questions about the most complex commensal of man. The first description was published by M. Berger (Berger 1845), G. Simon classified it systematically correct (Simon 1842a, 1842b) and R. Owen formed the to this day current name *Demodex folliculorum* (Owen 1843), whereas L. Akbulatova described the second human Demodex species, *D. brevis* (Akbulatova 1963).

The pilosebaceous unit colonizing mites show exceptional host specificity and occur in many mammals (Desch 2009; Ferrer et al. 2014), with genetic studies suggesting a symbiotic relationship over the last 100-200 million years (Ferrer et al. 2014).

The mite lives its whole life (egg, larva, protonymph, deutonymph, adult) on and in the human skin, whereby it lives for approximately two weeks (Spickett 1961b).

The body can be subdivided in roughly three parts: gnathosoma (food intake and sensory system), podosoma (movement and mating) and opisthosoma (nervous system, digestion and storage) (Desch and Nutting 1977). A number of putative endobacteria were isolated and characterized, yet no result was reproduced independently (Lacey et al. 2007; Tatu et al. 2016b; Tatu et al. 2016a; Tatu et al. 2017).

For scientific and clinical examination, several time-consuming, though non-satisfactory extraction methods exist (Lacey et al. 2016; Marks and Dawber 1971).

Clinically the mite can lead to primary (pityriasis folliculorum, rosacea-like and granulomatous demodicosis) and secondary demodicoses (with immunosuppression or other pre-existing conditions), which are mostly treated with ivermectin, but also other acaricides (Chen and Plewig 2014).

In the first publication "Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp." methods for rapid isolation of large numbers of mites by sucrose gradient centrifugation and for viability analysis by propidium iodide avital staining are described (Clanner-Engelshofen et al. 2018).

Kaplan-Meier plots were used to show that the staining did not negatively affect the survival of the mites. By means of these techniques, large quantities of the animals can be quickly obtained for future research and their viability can easily be investigated.

In the second publication "*Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*" the endobacterium of the Demodex mite was reproducibly isolated and characterized (Clanner-Engelshofen et al. 2019).

Its phenotypic and molecular biological properties were investigated in detail and compared with the corresponding reference strain *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM 44385. It was shown that the new subspecies *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* differs in numerous properties, such as the genome architecture of the repetitive sequences (ERIC-/REP-PCR), the presence of mycolic acids in the cell wall, the enzyme configuration, and the metabolism.

The new findings of this work should contribute to a better understanding of the biology, physiology, and anatomy of the most complex human commensal, *Demodex* spp., and promote further research in this field.

In the future, they will also allow studying the tripartite host-microbe relationship more closely and possibly open up new and optimized therapeutic options.

6. Veröffentlichung I

Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp.

Veröffentlicht in:

Clanner-Engelshofen BM, Ruzicka T, Reinholz M: Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp. Exp Appl Acarol. 2018 Sep;76(1):71-80.

DOI: 10.1007/s10493-018-0289-0

Impact Factor von Experimental & applied acarology (2018): 1,8

**Rang von Experimental & applied acarology
in der Kategorie "Entomology" (2018): 30/98 (69,4%)**

7. Veröffentlichung II

Corynebacterium kroppenstedtii subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*

Veröffentlicht in:

Clanner-Engelshofen BM, French LE, Reinholz M: *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2019 Nov; [epub ahead of print].

DOI: 10.1111/jdv.16069

Impact Factor von Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (2018): 5,1

Rang von Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology in der Kategorie "Dermatology" (2018): 6/66 (90,9%)

8. Literaturverzeichnis

1. Akbulatova L (1963) Demodicidosis of man. *Vestnik Dermat. i Venerol.*:34–42
2. Ayres S (1930) Pityriasis folliculorum (Demodex). *JAMA Dermatol* 21:19–24
3. Berger M (1845) Découverte d'une espèce d'animalcule vivant dans le cérumen de l'oreille chez l'homme. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences.*:1506
4. Chen W, Plewig G (2014) Human demodicosis: revisit and a proposed classification. *Br J Dermatol* 170:1219–1225. doi: 10.1111/bjd.12850
5. Clanner-Engelshofen BM, Ruzicka T, Reinholz M (2018) Efficient isolation and observation of the most complex human commensal, *Demodex* spp. *Exp Appl Acarol* 76:71–80. doi: 10.1007/s10493-018-0289-0
6. Clanner-Engelshofen BM, French LE, Reinholz M (2019) *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. doi: 10.1111/jdv.16069
7. Desch C (1989) The digestive system of *Demodex folliculorum* (Acari: Democidae) of man: a light and electron microscope study. *Progress in Acarology*:187–195
8. Desch C, Nutting WB (1972) *Demodex folliculorum* (Simon) and *D. brevis* akbulatova of man: Redescription and reevaluation. *J Parasitol* 58:169–177
9. Desch CE (1973) The biology of the demodicids of man. *Doctoral Dissertations 1896 - February 2014*. 4117., University of Massachusetts
10. Desch CE, Nutting WB (1977) Morphology and functional anatomy of *Demodex folliculorum* (Simon) of man. *Acarologia* 19:422–462
11. Desch CE (2009) Human hair follicle mites and forensic acarology. *Exp Appl Acarol* 49:143–146. doi: 10.1007/s10493-009-9272-0
12. Ferrer L, Ravera I, Silbermayr K (2014) Immunology and pathogenesis of canine demodicosis. *Vet Dermatol* 25:427–e65. doi: 10.1111/vde.12136
13. Fourie J, Dumont P, Halos L, Beugnet F, Pollmeier M (2013) Efficacy of a topical application of Certifect(R) (fipronil 6.26% w/v, amitraz 7.48% w/v, (S)-methoprene 5.63% w/v) for the treatment of canine generalized demodicosis. *Parasite* 20:46. doi: 10.1051/parasite/2013046
14. Gmeiner F (1908) *Demodex folliculorum* des Menschen und der Tiere. *Archiv für Dermatologie und Syphilis* 1908:25–96
15. Henle F (1841) Über einen Parasiten der Ohrenschmalzdrüse.: Beobachter aus der östlichen Schweiz. *Züricher naturforschende Gesellschaft*
16. Hu L, Zhao Y, Yang Y, Niu D, Yang R (2019) LSU rDNA D5 region: the DNA barcode for molecular classification and identification of *Demodex*. *Genome* 62:295–304. doi: 10.1139/gen-2018-0168
17. Jahns AC, Alexeyev OA (2012) Direct visualization of a gravid *Demodex* mite in human skin biopsy. *J Dtsch Dermatol Ges* 10:358. doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07878.x
18. Lacey N, Delaney S, Kavanagh K, Powell FC (2007) Mite-related bacterial antigens stimulate inflammatory cells in rosacea. *Br J Dermatol* 157:474–481. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08028.x
19. Lacey N, Russell-Hallinan A, Powell FC (2016) Study of *Demodex* mites: Challenges and Solutions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30:764–775. doi: 10.1111/jdv.13517
20. Lebon W, Beccati M, Bourdeau P, Bremont T, Bruet V, Cekiera A, Crosaz O, Darmon C, Guillot J, Mosca M, Pin D, Popiel J, Pomorska Handwerker D, Larsen D, Tielemans E, Beugnet F, Halos L (2018) Efficacy of two formulations of afoxolaner (NexGard(R) and NexGard

- Spectra(R)) for the treatment of generalised demodicosis in dogs, in veterinary dermatology referral centers in Europe. *Parasit Vectors* 11:506. doi: 10.1186/s13071-018-3083-2
21. Marks R, Dawber RP (1971) Skin surface biopsy: An improved technique for the examination of the horny layer. *Br J Dermatol* 84:117–123
 22. Miescher J (1843) Bericht über die Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft zu Basel.:191
 23. Mount GA, Grothaus RH, Baldwin KF, Haskins JR (1975) ULV sprays of propoxur for control of *Trombicula alfreddugesi*. *J Econ Entomol* 68:761–762. doi: 10.1093/jee/68.6.761
 24. Mueller RS, Bensignor E, Ferrer L, Holm B, Lemarie S, Paradis M, Shipstone MA (2012) Treatment of demodicosis in dogs: 2011 clinical practice guidelines. *Vet Dermatol* 23:86-96, e20-1. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.01026.x
 25. Nutting WB (1976a) Hair follicle mites (Acari: Demodicidae) of man. *Int J Dermatol* 15:79–98
 26. Nutting WB (1976b) Hair follicle mites (*Demodex* spp.) of medical and veterinary concern. *Cornell Vet* 66:214–231
 27. Nutting WB, Rauch H (1961) The effect of biotin deficiency in *Mesocricetus auratus* on parasites of the genus *Demodex*. *J Parasitol* 47:319–322
 28. Nutting WBM, Andrews JRH, Desch CE (1979) Studies in symbiosis: Hair follicle mites of mammals and man. *Journal of Biological Education* 13:315–321. doi: 10.1080/00219266.1979.9654274
 29. Owen R (1843) *Lectures on the Comparative Anatomy and Physiology of the Invertebrate Animals.*, London
 30. Pajarre R, Peura R (1977) Scanning electron microscopy of *Demodex brevis* (folliculorum). *Acta Derm Venereol* 57:529–531
 31. Sastre N, Francino O, Curti JN, Armenta TC, Fraser DL, Kelly RM, Hunt E, Silbermayr K, Zewe C, Sánchez A, Ferrer L (2016) Detection, Prevalence and Phylogenetic Relationships of *Demodex* spp and further Skin Prostigmata Mites (Acari, Arachnida) in Wild and Domestic Mammals. *PLoS ONE* 11:e0165765. doi: 10.1371/journal.pone.0165765
 32. Simon G (1842a) Über das Vorkommen lebender Tiere in den sogen. Mitessern (*Acne punctata*) der menschlichen Haut. *Medizinische Zeitung (Verein für Heilkunde in Preußen)*
 33. Simon G (1842b) Über eine in den kranken und normalen Haarsäck en des Menschen lebende Milbe. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin*:218
 34. Spickett SG (1961a) A preliminary note on *Demodex folliculorum* Simon (1842), as a possible vector of leprosy. *Lepr Rev* 32:263–268
 35. Spickett SG (1961b) Studies on *Demodex folliculorum* Simon (1842). I. Life history. *Parasitology* 51:181–192. doi: 10.1017/S003118200006858X
 36. Stromberg BE, Nutting WB (1972) Adaptive features of the exoskeleton and pigment deposits in *Demodex* spp. (Demodicidae). *Acarologia*:605–611
 37. Tatu AL, Clatici V, Cristea V (2016a) Isolation of *Bacillus simplex* strain from *Demodex folliculorum* and observations about Demodicosis spinulosa. *Clin Exp Dermatol* 41:818–820. doi: 10.1111/ced.12893
 38. Tatu AL, Ionescu MA, Clatici VG, Cristea VC (2016b) *Bacillus cereus* strain isolated from *Demodex folliculorum* in patients with topical steroid-induced rosaceiform facial dermatitis. *An Bras Dermatol* 91:676–678. doi: 10.1590/abd1806-4841.20165214
 39. Tatu AL, Ionescu MA, Cristea VC (2017) *Demodex folliculorum* associated *Bacillus pumilus* in lesional areas in rosacea. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 83:610–611. doi: 10.4103/ijdvl.IJDVL_921_16

40. Tulk (1844) The annals and Magazine of natural History including Zoology, Botany and Geology., XIII, London
41. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37:463–464. doi: 10.1099/00207713-37-4-463
42. Zewe CM, Graham J, Lam ATH, Ferrer L (2017) Demodicosis in a ferret caused by *Demodex canis*. *Vet Dermatol.* doi: 10.1111/vde.12454

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Markus Reinholz für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu promovieren, seine stets umfassende Unterstützung, der hervorragenden Betreuung und dem Bemühen diese Arbeit zu dem zu machen, was sie jetzt ist.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. mult. Thomas Ruzicka für die initiale Annahme meiner Doktorarbeit und dem Bereitstellen der wissenschaftlichen Infrastruktur. Ebenso gilt dieser Dank dem neuen ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Prof. Dr. med. Lars French, der diese Arbeit stets mit großem Interesse gefördert hat.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine „Laborkollegen“ (Doktoranden, Praktikanten, andere wissenschaftliche Mitarbeiter und Ärzte), die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, für Kurzweil und herausragende Stimmung im Labor sorgten, namentlich: Sara Charnowski, Enklajd Marsela, Dr. med. Markus Heppt, Theresa Steeb, Nora Jøntvedt, Barend Feldner, Yannik Eisele, Stefan Rebele, Robert Cohen, Claudia Kammerbauer, Hannah Schwaiger, Verena Kappler, Constanze Kuhlmann, Jana Blum, Benedikt Fuchs, Alexandra Birt und Dr. med. Orsolya Horvath.

Zu guter Letzt bedanke ich mich auch bei meiner Familie, meinen engsten Freunden und besonders meinem Freund David für Ablenkung und moralische Unterstützung besonders während anstrengender Phasen meiner Arbeit.

Vielen Dank!