

Aus der  
Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Kolonisation von *Candida species* bei Psoriasispatienten**

—

**Häufigkeit und Effekte auf Immunzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Elsner, Kevin Benjamin**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Ghoreschi

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Henes

Tag der Disputation: 02.03.2023

Für meine Eltern und Großmutter

1	Einleitung	10
1.1	Psoriasis	10
1.1.1	Pathophysiologie der Psoriasis	11
1.1.2	Diagnostik und klinische Einteilung	13
1.1.3	Therapie	14
1.1.3.1	Lokaltherapie	14
1.1.3.2	Systemtherapien	15
1.1.3.2.1	Fumarsäureester	15
1.1.3.2.2	Methotrexat	15
1.1.3.2.3	Phosphodiesterase-Hemmer	16
1.1.3.2.4	Retinoide	16
1.1.3.2.5	Biologika	17
1.1.3.3	Phototherapien	18
1.2	Pilze	19
1.2.1	Die Gattung <i>Candida</i>	20
1.2.2	<i>Candida albicans</i>	21
1.2.2.1	Die Immunantwort gegen <i>Candida albicans</i>	22
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Klinische Studie zur <i>Candida</i> Besiedlung bei Psoriasis	25
2.1.1.1	Probandenkollektiv	25
2.1.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	25
2.1.1.3	Aufklärung	25
2.1.2	Proben	26
2.1.2.1	Abstriche	26
2.1.2.2	Stuhlproben	26
2.1.2.3	Blut	26
2.1.2.4	Probenanalyse	26
2.2	Laborexperimentelle Untersuchung der Immunantwort auf <i>Candida spp.</i>	27
2.2.1	Candidastämme	27
2.2.1.1	<i>Candida albicans</i> SC5314	27
2.2.1.2	<i>Candida albicans</i> Isolat unter lokaler Psoriasis-therapie (I-LT)	27
2.2.1.3	<i>Candida albicans</i> Isolat unter Anti-IL-17 Therapie (I-IL-17)	27
2.2.2	Synchronisation von <i>Candida albicans</i>	28

2.2.3	Isolation, Stimulation und Ernte peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs).....	28
2.2.4	Isolation von RNA.....	30
2.2.5	Quantifizierung der RNA .....	31
2.2.6	Umschrieb von RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) 31	
2.2.7	qPCR.....	32
2.2.7.1	Quantifizierung der Zytokinantwort.....	35
2.3	Graphische und statistische Auswertung.....	36
2.4	Materialien und Geräte .....	37
2.4.1	Chemikalien.....	37
2.4.2	Geräte.....	37
2.4.3	Verbrauchsmaterialien.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Ergebnisse der klinischen Studie zur Besiedelung mit <i>Candida spp.</i> bei Psoriasis .....	39
3.1.1	Vergleich der Besiedelung mit <i>Candida species</i> .....	40
3.1.1.1	Die Besiedelung mit <i>Candida species</i> auf Psoriasisplaques und in der Achselhöhle .....	44
3.1.1.2	Die Besiedelung mit <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> im Mundraum	45
3.1.1.3	Nachweis von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in Stuhlproben	47
3.1.2	Die Auswirkungen von Alter, Geschlecht, Therapie und Schweregrad der Psoriasis auf die Besiedelung mit <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> .....	50
3.2	Die Untersuchung der <i>Candida</i> Immunantwort <i>in vitro</i> .....	55
3.2.1	Vergleich der Zytokinantwort bei Patienten mit und ohne Besiedelung von <i>Candida species</i> .....	56
3.2.2	Vergleich der Immunreaktion auf unterschiedliche <i>Candida albicans</i> Stämme.....	59
4	Diskussion	63
4.1	Die Prävalenz von <i>Candida species</i> in der Normalbevölkerung und bei Psoriasispatienten.....	63
4.2	Mögliche Einflussfaktoren auf eine Besiedelung mit <i>Candida species</i> .....	66
4.3	Unterschiede in der Immunogenität verschiedener <i>Candida albicans</i> Stämme und Vergleich der Immunantwort von mit <i>Candida species</i> besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten.....	70

5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Erklärung zum Eigenanteil	90
8	Veröffentlichungen	91

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wachstumsformen von <i>Candida albicans</i> .....	22
Abbildung 2: Das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers mit einem Dark Quencher.....	33
Abbildung 3: Nachweis von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> .....	43
Abbildung 4: Das Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> .....	43
Abbildung 5: Nachweis von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in der Mundhöhle .....	46
Abbildung 6: Das Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in der Mundhöhle.....	47
Abbildung 7: Nachweis von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> im Stuhl.....	49
Abbildung 8: Das Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in Stuhlproben.....	49
Abbildung 9: Nachweis von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in Abhängigkeit vom Alter .....	51
Abbildung 10: Nachweis von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in Abhängigkeit vom Geschlecht .....	52
Abbildung 11: Nachweis von <i>Candida species</i> in Abhängigkeit zur Therapie.....	54
Abbildung 12: Vergleich der Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, und TNF- $\alpha$ bei Psoriasispatienten mit und ohne Besiedelung von <i>Candida species</i> .....	59
Abbildung 13: Vergleich der Immunreaktion auf unterschiedliche <i>Candida albicans</i> Stämme bei Psoriasispatienten .....	62

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der reversen Transkription.....	32
Tabelle 2: Ablauf einer quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion mit TaqMan-Sonden im LightCycler®.....	34
Tabelle 3: Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden.....	35
Tabelle 4: Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> . .....	41
Tabelle 5: Die einzelnen isolierten Arten der Gattung <i>Candida</i> . .....	41
Tabelle 6: Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> aus Abstrichen der Achselhöhle .....	44
Tabelle 7: Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> aus Abstrichen der Mundschleimhaut .....	45
Tabelle 8: Wachstum von <i>Candida species</i> und <i>Candida albicans</i> in Stuhlproben.....	48
Tabelle 9: Nachweis von <i>Candida species</i> in Abhängigkeit zur Therapie.....	53

## Abkürzungsverzeichnis

6FAM	= 6-Carboxyfluorescein
95 %-KI	= 95 %-Konfidenzintervall
ACK Lysepuffer	= Ammoniumchlorid-Kalium Lysepuffer
ATCC	= American Type Culture Collection
BBQ	= BlackBerry® Quencher
C.	= <i>Candida</i>
cAMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
C <sub>p</sub> -Wert	= crossing point
cDNA	= komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	= Desoxyribonukleosidtriphosphate
DLQI	= Dermatologischer Lebensqualitäts-Index
E	= Effizienz
FET	= Exakter-Fisher-Test
HIV	= Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	= humanes Leukozytenantigen
IFN	= Interferon
IL	= Interleukin
I-IL-17	= <i>Candida albicans</i> Isolat unter Anti-IL-17 Therapie
I-LT	= <i>Candida albicans</i> Isolat unter lokaler Psoriasisstherapie
LPS	= Lipopolysaccharide
mRNA	= messenger Ribonukleinsäure
MSH	= Mundschleimhaut
NF-κB	= nukleärer Faktor kappa B
NK-Zelle	= Natürliche Killerzelle
NOD	= nukleotidbindende Oligomerisationsdomänen
OR	= Odds Ratio



P	= Signifikanzwert
PBMCs	= periphere mononukleäre Blutzellen
PASI	= Psoriasis Area and Severity Index
PCR	= Polymerase Kettenreaktion
PBS	= Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE-4	= Phosphodiesterase-4
PSORS 1	= Psoriasis-Suszeptibilitätslokus 1
PUVA	= Psoralen plus UV-A
qPCR	= quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RNA	= Ribonukleinsäure
<i>spp.</i>	= <i>species</i>
Th-Zelle	= T-Helferzelle
TLR	= Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	= Tumornekrosefaktor alpha
U	= Mann-Whitney-U-Test
UV	= ultraviolett
$\chi^2$	= Chi-Quadrat-Test
YPD-Medium	= Yeast Extract-Peptide-Dextrose Medium
Z	= Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

# 1 Einleitung

## 1.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine chronisch entzündlich verlaufende Systemerkrankung, die primär Haut, Nägel und Gelenke befällt. Landläufig ist sie auch unter dem Namen Schuppenflechte bekannt. In Deutschland sind 2,5 % der Bevölkerung an Psoriasis erkrankt, wobei die Zahl der Betroffenen mit dem Alter ansteigt und Männer geringfügig häufiger betroffen sind (1). Die Psoriasis wird in fünf klinische Formen unterteilt: Erythrodermia psoriatica, Psoriasis guttata, Psoriasis inversa, Psoriasis pustulosa und Psoriasis vulgaris (2). Am häufigsten ist die Psoriasis vulgaris oder auch Plaque Psoriasis. Traditionell wird die Psoriasis je nach Alter bei Erstmanifestation in zwei Typen unterteilt. Erstmanifestationen um das 20. Lebensjahr (Typ 1) verlaufen meist deutlich schwerer als späte (Typ 2), die meist im fünften Lebensjahrzent erstmals in Erscheinung treten. Außerdem zeigt der frühe Typ eine höhere familiäre Häufung (3). Charakteristisch für die Psoriasis vulgaris sind scharf begrenzte, erythematöse Plaques mit groblamellärer Schuppung an den Extremitätenstreckseiten. Häufig kommt es auch zu einem Befall der Kopfhaut, der Ohren, sowie der Haut über dem Kreuzbein, der Rima ani und entlang des Bauchnabels. Bei der Psoriasis inversa sind hingegen typischerweise Hautfalten und die Beugeseiten von Armen und Beinen betroffen. Bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen findet sich häufig eine Psoriasis guttata. Typisch für diese sind tropfenförmige Papeln. Die Psoriasis pustulosa kann generalisiert am ganzen Körper oder lokalisiert an den Handflächen und Fußsohlen vorliegen. Sie zeigt sich durch sterile weiße Pusteln auf rotem Grund. Bei der seltenen Erythrodermia psoriatica sind mindestens 80% der Körperoberfläche befallen. Sie kann sich aus jeder anderen Form einer Psoriasis entwickeln und ist die schwerste Verlaufsform einer Schuppenflechte. Neben einer generalisierten Rötung der Haut, Ödemen, Plaques und Schuppungen kann es auch zu systemischen Komplikationen wie Fieber und Volumenmangel bis hin zu einer Herzinsuffizienz kommen (4).

Bei bis zu 30 % aller Patienten mit Psoriasis bildet sich eine Psoriasisarthritis aus (5, 6). Typischerweise sind die Fingerendgelenke betroffen. Ein strahlenförmiger Befall aller Fingergelenke ist deutlich seltener. Noch seltener sind Veränderungen an großen Gelenken wie der Wirbelsäule, der Iliosakralgelenke oder der Hüftgelenke. Bei bis zu

90% aller Patienten mit Psoriasisarthritis treten Veränderungen an Finger- und Zehennägeln auf (2, 7). Es wird angenommen, dass 80 bis 90% aller Patienten mit Psoriasis mindestens einmal in ihrem Leben von Nagelveränderungen betroffen sind (2, 6). Charakteristisch sind die sogenannten Ölflecken und Tüpfelnägel. Die gelbbraunen Ölflecken entstehen durch Veränderungen im Nagelbett. Tüpfelnägel sind kleine trichterartige Einsenkungen auf der Nageloberfläche und die häufigste psoriatische Nagelveränderung (7).

Die durch die Schuppenflechte ausgelösten Hautveränderungen gehen bei vielen Patienten mit Stigmatisierungen, einer Einschränkung der Lebensqualität und einem hohen Leidensdruck einher (8, 9). Der Verlust an Lebensqualität in Folge einer Psoriasis ist dabei vergleichbar mit der Beeinträchtigung von Patienten durch chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, Arthritiden oder Krebs (10). Dieser Leidensdruck wird durch häufige Komorbiditäten wie Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes mellitus weiter verstärkt (2, 11). Eine schwere Psoriasis ist sogar mit einer im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöhten Sterblichkeit assoziiert (12). Außerdem scheint ein Zusammenhang zwischen der Schuppenflechte mit anderen chronisch entzündlichen Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn zu bestehen (11).

### 1.1.1 Pathophysiologie der Psoriasis

Die Pathogenese der Schuppenflechte beruht sowohl auf einer genetischen Prädisposition als auch auf exogenen Umweltfaktoren. Neben vielen weiteren Genen, die mit der Psoriasis assoziiert werden, ist der Psoriasis-Suszeptibilitätslokus 1 (PSORS 1) auf dem Chromosomen 6p21 am wichtigsten. PSORS 1 kodiert das humane Leukozytenantigen (HLA) Cw6. Humane Leukozytenantigene finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und ermöglichen die Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten. PSORS 1 findet sich insbesondere bei Patienten mit Psoriasis guttata und der frühen Form der Psoriasis vulgaris (3, 13, 14). Bei dem Typ 2 der Psoriasis vulgaris besteht jedoch keine Assoziation zu PSORS 1 (15). In den letzten Jahren wurden durch Genom-weite Assoziationsstudien eine Reihe weiterer Genloci mit Einzelnukleotid Polymorphismen identifiziert, die mit dem Risiko an einer Psoriasis zu erkranken deutlich vergesellschaftet sind. Hierzu gehören unter anderem Gene, die Zytokine wie Interleukin (IL)-23 kodieren, aber auch

Gene, die für intrazelluläre Signalmoleküle kodieren, welche wiederum von Zytokinen wie IL-17 oder IL-23 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) genutzt werden. Bestimmte innere und äußere Schlüsselreize sind in der Lage den Ausbruch einer Schuppenflechte zu provozieren oder eine bereits bestehende Psoriasis zu verschlimmern. Zu diesen sogenannten Triggerfaktoren zählen unter anderem Hautirritationen, Rauchen, psychischer Stress, Streptokokkeninfekte sowie Medikamente wie beta-Blocker (16, 17). Außerdem wird vermutet, dass eine Kolonisation der Haut mit *Candida albicans*, *Malassezia species (spp.)* und *Staphylococcus aureus* eine bestehende Psoriasis möglicherweise verschlimmern kann (18).

Die Ursache der psoriatischen Hautläsionen liegt in einer fehlerhaften Interaktion zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (2). In psoriatischer Haut teilen sich die Keratinozyten bei gleichzeitig abnormaler Differenzierung deutlich schneller, als in gesunder Haut (19). Zu Beginn der Entzündung bewirken externe Trigger wie Mikroorganismen, Stress oder Verletzungen eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems (13, 20). Zellen des angeborenen Immunsystems beginnen daraufhin mit der Produktion von proinflammatorischen Botenstoffen wie den IL-1 $\beta$  und IL-6, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sowie TNF- $\alpha$ , was wiederum zu einer Aktivierung von dendritischen Zellen führt (13, 21). Gleichzeitig steigern Keratinozyten die Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie LL37 (22). LL37 verstärkt physiologischerweise die Immunantwort gegen Mikroorganismen wie *Candida albicans* (23). In psoriatischer Haut bildet es Komplexe mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) und soll so myeloische und plasmazytoide dendritische Zellen stimulieren (24, 25). Nach Aktivierung produzieren myeloische dendritische Zellen die Interleukine 6, 12 und 23 sowie TNF- $\alpha$  (24, 26, 27). Die plasmazytoiden dendritischen Zellen hingegen beginnen mit der Produktion der Interferone  $\alpha$  und  $\beta$  (22, 24, 25, 28). IL-12, welches genauso wie IL-23 als Dimer die Untereinheit p40 besitzt, ermöglicht naiven T-Lymphozyten eine Differenzierung zu IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  produzierenden T-Helferzellen (Th-Zelle) vom Typ1 (13). IL-23 hingegen bewirkt zusammen mit weiteren Botenstoffen wie IL-6, IL-1 $\beta$  und transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  eine Differenzierung zu Th17-Zellen (29-33). Th17-Zellen produzieren Botenstoffe wie IL-17A, IL-17F, IL-22 und TNF- $\alpha$  und dienen physiologischerweise der Abwehr von Bakterien und Pilzen (26, 34). Jedoch werden Th17-Zellen auch mit autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen assoziiert (34).

Durch Bindung an den IL-17-Rezeptor aktiviert IL-17A eine unter anderem über das CCAAT/Enhancer-Binding-Protein und den nukleären Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) laufende Signalkaskade und stimuliert auf diese Weise Haut- und Immunzellen (35). Unter dem Einfluss von IL-17A, IL-22 und TNF- $\alpha$  kommt es zu einer vermehrten Proliferation und Produktion proinflammatorischer Botenstoffe aber auch von antimikrobiellen Peptiden durch Keratinozyten, wodurch in der Folge eine Etablierung von Bakterien und Pilzen auf Plaques weitestgehend verhindert wird (36-38). In Psoriasis Plaques wird IL-17 jedoch nicht nur von T-Helferzellen gebildet, sondern gleichzeitig auch durch weitere Immunzellen wie zum Beispiel Mastzellen produziert, wodurch die Wirkung weiter verstärkt wird (39). Die Anzahl antiinflammatorischer Th2-Zellen ist hingegen deutlich erniedrigt oder fehlt (40, 41). Infolgedessen kommt es zu einer massiven Fehlregulation und Proliferation der Hautzellen. Durch die gesteigerte Keratinozytenproliferation bei gleichzeitig geringer Differenzierung kommt es zu einer epidermalen Verdickung und den für die Psoriasis charakteristischen Hautveränderungen. Im Zuge der Entzündung werden in großer Menge Botenstoffe freigesetzt, die das Wachstum von Blutgefäßen anregen und Leukozyten rekrutieren (2, 23, 42). Durch diese stetige Einwanderung von proinflammatorischen Zellen wird die Entzündung in einem *Circulus vitiosus* aufrechterhalten und weiter verstärkt (2).

### 1.1.2 Diagnostik und klinische Einteilung

Die Diagnosestellung einer Schuppenflechte erfolgt in erster Linie klinisch. Psoriatische Läsionen stellen sich meist als rote, scharf begrenzte und schuppene Effloreszenzen wie Papeln oder Plaques dar. Durch Kratzen an einer Plaque lassen sich drei für die Schuppenflechte spezifische Phänomene auslösen. Zuerst lassen sich die Schuppen wie Wachs von der Haut ziehen (Kerzenwachsphänomen). Im Anschluss scheint die gerötete Lederhaut durch die restliche Epidermis (Phänomen des letzten Häutchens). Nach vollständiger Entfernung der Epidermis kommt es zu punktförmigen Einblutungen, dem Phänomen des blutigen Taus. Die Histopathologie dient der weiteren Diagnosesicherung. Dabei zeigen sich im Gewebeschnitt charakteristische Veränderungen. Die Epidermis ist in der Regel deutlich verbreitert und übermäßig stark verhornt. Das Stratum granulosum fehlt in den meisten Fällen. Die Reteleisten hingegen sind verlängert und die Papillarkörper aufgedunsen. Entzündungsbedingt finden sich in psoriatischer Haut

vermehrt Lymphozyten und Makrophagen. Typisch sind auch die aus neutrophilen Granulozyten bestehenden, Munro-Mikroabszesse unterhalb der Hornschicht.

Die objektive Bestimmung des Schweregrades erfolgt in der Regel mittels Bestimmung des Psoriasis Area and Severity Index (PASI). In die Berechnung fließen der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche sowie deren Rötung, Schuppung und Dicke ein, wodurch sich ein Wert zwischen 0 und 72 ergibt (43). Dabei spricht ein PASI von  $\leq 10$  für eine milde Psoriasis. Ein PASI  $>10$  wird als eine mittelschwere bis schwere Psoriasis, ein PASI  $>20$  als sehr schwere Psoriasis bewertet (44, 45).

### 1.1.3 Therapie

Die Therapie der Psoriasis beruht auf unterschiedlichen Prinzipien und zielt primär auf eine Abheilung der Hautentzündung und gleichzeitig Steigerung der Lebensqualität ab. An erster Stelle der Psoriasistherapie steht dabei eine konsequente Basistherapie. Hierzu dient die Keratolyse und somit die Entfernung der Schuppung. Sie besteht aus einer lokalen Hautpflege mit fett-, harnstoff- und salicylsäurehaltigen Cremes oder Salben und sollte von allen Patienten mit Psoriasis durchgeführt werden. Zusätzlich zur Basistherapie stehen je nach Schwere lokale, systemische und phototherapeutische Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung.

#### 1.1.3.1 Lokaltherapie

Zur Behandlung einer milden Psoriasis ist meist eine topische Therapie ausreichend. Lokaltherapeutika enthalten meist Kortikosteroide, Teerderivate oder Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga. Glukokortikosteroide verlangsamen die Proliferation von Keratinozyten und wirken entzündungshemmend. Jedoch sind insbesondere hochpotente Glukokortikosteroide nicht für eine Langzeittherapie geeignet, da längerer Gebrauch eine Hautatrophie begünstigt. Außerdem erhöht sich bei dauerhafter großflächiger Anwendung von hochpotenten Glukokortikosteroiden das Risiko systemischer Nebenwirkungen. Dazu zählen unter anderem Bluthochdruck, eine Steigerung des Blutzuckers, Osteoporose und Veränderungen im Fettstoffwechsel. Zur Einsparung von Glukokortikosteroiden können sie mit Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga kombiniert werden, die auch das Rebound Phänomen von Glukokortikosteroiden verhindern. Teerderivate wie Dithranol werden vor allem im stationären Bereich eingesetzt. Dithranol scheint primär antiproliferativ auf Lymphozyten und Keratinozyten zu wirken (46, 47). Calcitriol ist die

biologisch wirksame Form des Vitamin D<sub>3</sub>. Es besitzt ebenso wie seine Strukturanaloga Calcipotriol und Tacalcitol eine regulatorische Wirkung auf dendritische Zellen, Makrophagen und T-Zellen. Bei Keratinozyten bewirken Calcitriolanaloga eine Erhöhung des Differenzierungsgrades bei gleichzeitig verminderter Proliferationsrate (48).

#### 1.1.3.2 Systemtherapien

Bei mittlerer und schwerer Psoriasis, sowie bei Psoriasis mit Gelenkbeteiligung (Psoriasisarthritis) sind häufig systemisch wirkende Medikamente notwendig. Zu den gängigen Systemtherapeutika zählen Fumarsäureester, Methotrexat (MTX), Phosphodiesterase-Hemmer, Retinoide sowie molekularbiologisch hergestellte monoklonale Antikörper (49). Die Wirksamkeiten der verschiedenen Therapien an Haut und Gelenken sind jedoch unterschiedlich.

##### 1.1.3.2.1 Fumarsäureester

Dimethylfumarat und andere Fumarsäureester haben eine immunmodulatorische und antioxidative Wirkung. Ihre genaue Wirkweise ist komplex und wird auch heute noch erforscht. Auf molekularer Ebene bewirken Fumarsäureester eine Aktivierung des Niacin Rezeptor 1 und von Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2), gleichzeitig interagieren sie mit intrazellulären Glutathion und inhibieren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (50, 51). In der Folge kommt es zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Botenstoffe wie IL-12 und IL-23 und die zuvor von Th1- und Th17-Zellen dominierte Immunantwort verschiebt sich zu einer mehr regulatorischen Th2-Zellantwort (50, 52). Fumarsäureester schützen Keratinozyten vor oxidativen Stress und hemmen ihre Proliferation (53-55).

##### 1.1.3.2.2 Methotrexat

Als Antagonist der Folsäure hemmt Methotrexat reversibel die Dihydrofolsäure-Reduktase, welche essentiell für die Synthese von DNA-Bausteinen ist. Methotrexat hemmt somit die Bildung der DNA und damit auch die Proliferation von Zellen. Bei unzureichender Einzeltherapie kann Methotrexat mit einer Phototherapie kombiniert werden. Hingegen wird bei ausgedehnter Psoriasis, bei Befall von Nägeln und Gelenken zusätzlich oft ein Biologikum verwendet. Unter Einnahme von Methotrexat kommt es häufig zu Übelkeit und Erbrechen sowie einer Erhöhung der Leberenzyme. Eine

Suppression des Knochenmarkes und schwere Organschäden, wie zum Beispiel an Leber, Lunge und Nieren sind zwar verhältnismäßig selten, stellen jedoch ernstzunehmende und schwere Komplikationen dar und erfordern eine Unterbrechung der Therapie (49). Zur besseren Verträglichkeit, Reduktion von Nebenwirkungen und zur Vermeidung eines Folsäuremangels wird begleitend Folsäure 24 bis 48 Stunden nach Methotrexat Gabe verordnet. Dennoch ist unter der Therapie das Risiko embryonaler Fehlbildungen stark erhöht, weshalb Methotrexat nur bei konsequenter Kontrazeption verwendet werden darf. Lange Zeit wurde auch ein erhöhtes Lymphomrisiko diskutiert. Dies konnte jedoch durch umfassende Studien widerlegt werden (56-58).

#### 1.1.3.2.3 Phosphodiesterase-Hemmer

Zugelassen zur Behandlung der Psoriasis ist der selektive Phosphodiesterase-4-Hemmer Apremilast. Zur Verstärkung der antipsoriatischen Wirkung besteht die Möglichkeit einer Kombination mit anderen Systemtherapeutika wie Methotrexat. Die unter anderem in Leukozyten und anderen Gewebezellen vorkommende Phosphodiesterase-4 (PDE-4) dient dem Abbau des Botenstoffes cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Durch kompetitive Hemmung der PDE-4 erhöht Apremilast die Menge an cAMP in Leukozyten, was unter anderem zu einer Herabregulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt (59). In der Folge kommt es zu einer verminderten Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-17, IL-23 und TNF- $\alpha$ . Gleichzeitig kommt es unter Behandlung mit Apremilast zu einer gesteigerten Synthese des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (60, 61). Auf die Proliferation von Keratinozyten wirkt es regulativ, wodurch sich die Dicke der Epidermis verringert und in der Folge das Hautbild verbessert (61-63).

#### 1.1.3.2.4 Retinoide

Retinoide, wie zum Beispiel Acitretin, sind synthetisch erzeugte Vitamin A Derivate, die eine immunmodulatorische und antiinflammatorische Wirkung besitzen. Sie fördern die Differenzierung von Keratinozyten und vermindern gleichzeitig deren Proliferation (64, 65). Ihre genaue Wirkweise ist jedoch nicht vollkommen geklärt (65). Vitamin A Derivate wirken besonders gut bei pustulöser Psoriasis und Erythrodermia psoriatica (4, 65, 66). Zu beachten ist, dass unter Retinoidtherapie nahezu alle Patienten trockene Schleimhäute entwickeln (49). Retinoide sind stark teratogen und dürfen aus diesem Grund bei Frauen im gebärfähigen Alter nur unter konsequenter Kontrazeption eingesetzt werden (49, 65).



#### 1.1.3.2.5 Biologika

Unter Biologika werden monoklonale Antikörper und andere Proteine verstanden, die sich zielgerichtet gegen bestimmte im Entzündungsprozess beteiligte Strukturen richten. Die zur Therapie der Psoriasis verwendeten Biologika richten sich gegen, IL-12/IL-23, IL-17 und TNF- $\alpha$ . Bei ausgeprägter Entzündungsaktivität können Adalimumab, Ixekizumab und Secukinumab als Erstlinientherapeutika verwendet werden. Andere Biologika wie Infliximab oder Ustekinumab werden als Zweitlinientherapeutika eingesetzt, wenn eine Behandlung mit anderen systemischen Medikamenten oder eine Phototherapie nicht ausreicht, nicht vertragen wird oder kontraindiziert ist (49). Die neueste Gruppe der Biologika für die Behandlung der Psoriasis bilden Antikörper gegen IL-23. Alle in der Psoriasis therapie verwendeten Biologika gehen aufgrund ihres immunsuppressiven Charakters mit einem erhöhten Risiko für Infektionskrankheiten einher. Im Rahmen dieser Arbeit ist dabei besonders interessant, dass unter immunsuppressiver Therapie ein erhöhtes Risiko für Candida-Infektionen besteht. Diese Candidosen verlaufen jedoch meist eher milde (67-72).

Ustekinumab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen IL-12 und IL-23 richtet. Dabei bindet Ustekinumab das Protein p40, eine in beiden Zytokinen vorkommende Untereinheit (73). IL-12 induziert die Bildung von Th1-Zellen, wohingegen IL-23 die Entwicklung von Th17-Zellen fördert (13, 29-31). Ustekinumab bindet die Untereinheit p40 und blockiert in der Folge somit die Wirkung beider Zytokine. Die mittlerweile zugelassenen monoklonalen Antikörper Guselkumab, Risankizumab und Tildrakizumab sind im Gegensatz zu Ustekinumab selektive IL-23 Inhibitoren, welche die p19 Untereinheit von IL-23 binden.

Ixekizumab und Secukinumab sind ebenfalls monoklonale Antikörper und richten sich gegen IL-17A, einem zentralen Botenstoff in der Pathogenese der Psoriasis. IL-17A wird von Th17-Zellen und weiteren Zellen des Immunsystems freigesetzt und wirkt proinflammatorisch (26). Keratinozyten werden durch IL-17A stimuliert, was zu einer überschießenden Proliferation mit geringer Differenzierung und letztendlich zur Entstehung von Plaques führt. Ferner stimuliert IL-17A in Keratinozyten die Bildung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) (36, 74). Durch Blockade dieses Signalweges wird der Entzündungsverlauf unterbrochen, wodurch es in der Folge zu einer Verbesserung der klinischen Symptome kommt. Von allen in der Psoriasis therapie verwendeten Biologika

wurden bei Inhibitoren von IL-17 jedoch am häufigsten Pilzinfektionen insbesondere mit *Candida* beobachtet, da IL-17A ein zentraler Bestandteil der Candidaimmunantwort ist (67-71, 75-79). Mittlerweile sind auch Antikörper gegen den IL-17 Rezeptor A (IL-17RA; Brodalumab) und gegen die beiden IL-17 Zytokine IL-17A und IL-17F (Bimekizumab) für die Behandlung der Psoriasis zugelassen.

Die TNF-Blocker Adalimumab, Etanercept und Infliximab richten sich gegen TNF- $\alpha$ . Adalimumab und Infliximab sind monoklonale Antikörper. Etanercept hingegen ist ein Rezeptor-Fusionsprotein. Sie alle können in Kombination mit Methotrexat verwendet werden. TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin. In psoriatischer Haut wird es von einer Vielzahl von Zellen wie Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten produziert (2, 19). Bereits zu Beginn der Entzündung wird es von Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt und spielt somit eine wichtige Rolle in der Aktivierung von dendritischen Zellen (13, 20). TNF- $\alpha$  steigert die transendotheliale Migration von Leukozyten in die Haut und induziert gleichzeitig die Bildung von weiteren entzündungsfördernden Botenstoffen und zusammen mit IL-17A auch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (36, 38, 74, 80). Ebenso wie IL-17 beeinflusst TNF die Proliferation von Keratinozyten (81). TNF-Blocker binden TNF- $\alpha$  und neutralisieren somit seine Wirkungen.

#### 1.1.3.3 Phototherapien

Die positive Wirkung von Sonnenlicht auf eine Vielzahl von Hautkrankheiten ist bereits seit dem Altertum bekannt (82). In der Psoriasistherapie wird heutzutage jedoch primär ultraviolette (UV) Strahlung verwendet. Diese lässt sich je nach Wellenlänge weiter in UV-A-, UV-B- und UV-C-Strahlung unterteilen. Therapeutisch wird UV-A in der Regel im Rahmen einer Psoralen plus UV-A (PUVA) Behandlung oder UV-B eingesetzt. Psoralen erhöht die Lichtempfindlichkeit der Haut. Es kann entweder als systemische PUVA-Therapie in Tablettenform eingenommen werden oder lokal durch psoralenhaltige Cremes beziehungsweise in Form einer Bade-PUVA-Behandlung aufgetragen werden. UV-B-Strahlung wird meist als Schmalspektrums-Lichttherapie bei 311 nm angewendet. Phototherapien sind in der Regel sehr wirksam und führen bereits innerhalb von zwei Wochen zu einer ersten Besserung der Psoriasis. Unter dem Einfluss von UV-Strahlen verschiebt sich die von Th1- und Th17-Zellen dominierte Immunantwort zu einer regulatorischen Immunantwort (83). In der Folge kommt es zu einem Abfall von

proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, IL-17 und IL-23 (83-85). Die Expression des entzündungshemmenden Botenstoffes IL-4 wird hingegen gesteigert (85). Gleichzeitig induziert UV-Strahlung die Apoptose von Lymphozyten und reduziert die Anzahl epidermaler Langerhans Zellen (83, 86, 87).

## 1.2 Pilze

Pilze zählen genauso wie Pflanzen und Tiere zu den eukaryontischen Lebensformen. Im Gegensatz zu den Pflanzen besitzen sie keine Chloroplasten. Ihren Energiebedarf decken sie durch den Abbau organischer Substanzen. Charakteristisch für Pilze ist der molekulare Aufbau ihrer Plasmamembranen und ihrer Zellwände. Die Plasmamembran der Pilze besitzt, anders als die tierischer Zellen, kein Cholesterin, sondern wird mehrheitlich aus Ergosterin gebildet. Die äußere Zellwand der Pilze wird größtenteils aus Eiweißmolekülen sowie den Polysacchariden Glukan, Mannan und gegebenenfalls Chitin aufgebaut. Chitinhaltige Pilze werden nach der botanischen Klassifikation auch als echte Pilze bezeichnet. Im medizinischen Bereich werden die klinisch relevanten Pilze für gewöhnlich jedoch nicht nach den Regeln der Botanik klassifiziert. In der medizinischen Mykologie werden Pilze nach dem DHS-System in drei Gruppen eingeteilt, wobei D für Dermatophyten, H für Hefepilze und S für Schimmelpilze steht.

Dermatophyten siedeln auf der Haut und den Hautanhangsgebilden von Menschen und Tieren. Morphologisch werden sie in die drei Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton* unterteilt (88). Klinisch sind sie der Auslöser der Tinea. Hefepilze sind in der Natur nahezu ubiquitär verbreitet. Aufgrund der Tatsache, dass sie sich durch Knospung teilen können, werden sie synonym auch als Sprosspilze bezeichnet. Die größte klinische Relevanz besitzt die Gattung *Candida*, deren Vertreter zum Teil systemische Mykosen verursachen können. Ebenfalls in der Lage systemische Infektionen auszulösen sind Hefepilze der Gattungen *Cryptococcus* und *Trichosporon*. Sprosspilze der Gattung *Malassezia* gehören zur physiologischen Hautflora. Sie sind jedoch bei starker Vermehrung Auslöser der auch als Kleienflechte bezeichneten *Pityriasis versicolor*. Hefen der Gattung *Saccharomyces* sind hingegen apathogen und werden in der Lebensmittelproduktion eingesetzt. Dort dient insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* als Backtriebmittel oder wird bei Herstellung von Wein und

Bier verwendet. Schimmelpilze sind ebenso wie Hefepilze auch nahezu ubiquitär in der Umwelt verbreitet. Von der großen Anzahl der verschiedenen in der Natur vorkommenden Schimmelpilze ist jedoch nur ein kleiner Anteil von klinischer Relevanz (89). Infektionen mit Schimmelpilzen treten vor allem bei starker Immunsuppression auf und äußern sich meist durch einen Befall von Haut, Herzbeutel, Lunge, der Nasennebenhöhlen oder des zentralen Nervensystems. Die größte medizinische Bedeutung haben hierbei Pilze der Gattung *Aspergillus* (89, 90). Neben Infektionen können Schimmelpilze jedoch auch Allergien und Vergiftungen durch Mykotoxine auslösen. Mykotoxine werden insbesondere über kontaminierte Lebensmittel übertragen und besitzen entweder eine direkt organschädigende, hormonähnliche, mutagene oder teratogene Wirkung (89, 91). Apathogene Schimmelpilze werden hingegen ebenso wie bestimmte Hefen in der Lebensmittelproduktion eingesetzt. Andere Stämme dienen der pharmazeutischen Industrie als Grundlage zur Produktion von Medikamenten wie Antibiotika oder Statinen.

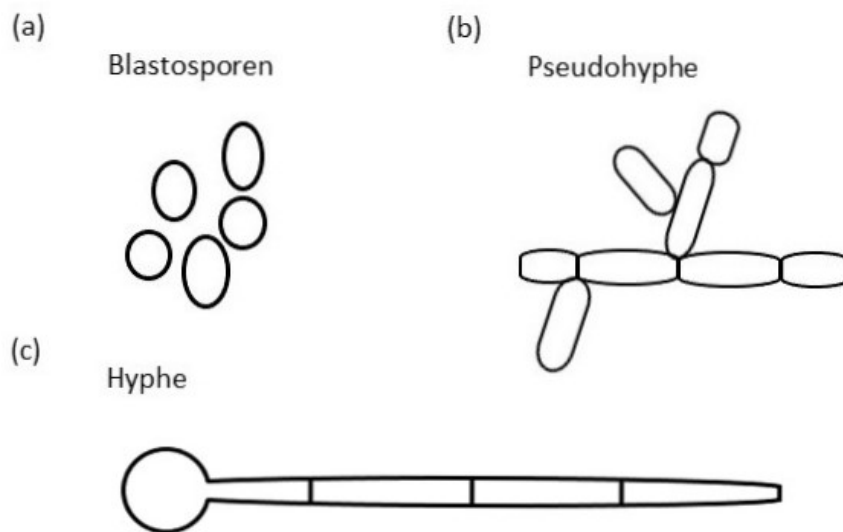
### 1.2.1 Die Gattung *Candida*

Die Gattung *Candida* besteht aus einer heterogenen Gruppe verschiedener Arten, die sich zum Teil deutlich in ihrer Morphologie und Größe, dem Aufbau ihrer Zellwände, ihren Wachstumsbedingungen sowie ihrer Virulenz unterscheiden (92). Sie besiedeln als Kommensale Haut und Schleimhäute und verursachen im gesunden Organismus nur selten Beschwerden. *C. albicans* und *C. dubliniensis* sind polymorphe Pilze. Sie bilden somit nicht nur einzellige rundovale Hefezellen, die sogenannten Blastosporen, sondern können auch als Hyphe und Pseudohyphe wachsen (92, 93). *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* sind hingegen nicht in der Lage Hyphen auszubilden (92). *C. albicans* ist ein fakultativer Krankheitserreger, der sich insbesondere bei geschwächtem Organismus, wie zum Beispiel im Rahmen einer HIV-Infektion, manifestiert. Von allen Pilzen der Gattung *Candida* besitzt er das größte pathogene Potential und ist der häufigste Verursacher einer Candidose (94). *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* sind ebenfalls fakultativ pathogene Mikroorganismen. *C. lambica* hingegen verursacht nur vereinzelt Beschwerden. Infektionen mit *Candida species* manifestieren sich klinisch durch einen Befall der Haut, der Schleimhäute oder als systemische Candidosen.

### 1.2.2 *Candida albicans*

*Candida albicans* ist ein fakultativ pathogener Hefepilz, der beim Menschen vorwiegend die Schleimhäute von Mund, Darm und Vagina besiedelt. Infektionen treten vermehrt bei Immunsupprimierten und onkologischen Patienten auf. Aber auch Behandlungen mit Antibiotika, chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, der Einsatz von Plastikkathetern oder erhöhte Östrogenspiegel begünstigen Infektionen durch *Candida albicans*. Candidosen können lokal auf Haut, Nägel, Schleimhäute oder den Urogenitaltrakt beschränkt sein. Systemische Infektionen sind meist Folge einer hämatogenen Ausbreitung und manifestieren sich insbesondere in Bauchspeicheldrüse, Knochenmark, Leber, Milz und dem zentralen Nervensystem (95).

Aktuell sind 18 verschiedene Klade von *Candida albicans* bekannt (96). Die verschiedenen Stämme unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihrer genetischen Ausstattung und ihrer Virulenz (97, 98). Als polymorpher Pilz kann *Candida albicans* zwischen verschiedenen morphologischen Formen wechseln. Blastosporen, Hyphen und Pseudohyphen stellen dabei die häufigsten Formen dar. Chlamydosporen werden als Überdauerungsform unter schlechten Umweltbedingungen ausgebildet (99, 100). Blastosporen sind einzellige rund bis ovale Hefezellen. Hyphen und Pseudohyphen sind längliche und teils verzweigte Verbände aus mehreren Zellen. Pseudohyphen bestehen aus ellipsoiden Zellen mit mindestens 2,8 µm Breite mit deutlichen Einschnürungen zwischen den einzelnen Zellen. Hyphen hingegen bestehen aus tubenförmigen Einheiten, die durch echte Septen ohne Einziehungen verbunden sind (101, 102). Im Vergleich zu einzelligen Hefen gelten Hyphen und Pseudohyphen als virulenter (93, 103). Der Übergang zur Hyphe erleichtert den Übertritt und die Ausbreitung ins umliegende Gewebe. Hyphen exprimieren vermehrt Virulenzfaktoren wie Adhäsine, hydrolytische Enzyme, Invasine und Toxine (104-108). Gleichzeitig bietet der Wechsel zur Hyphenform dem Pilz Schutz vor Phagozytose. Veränderungen der Zellwand erschweren Makrophagen die Erkennung (93, 109). Zusätzlich sind bereits phagozytierte Hyphen in der Lage Makrophagen mechanisch und durch Einleitung des programmierten Zelltodes abzutöten und sich somit zu befreien (110).



**Abbildung 1: Wachstumsformen von *Candida albicans***

Als polymorpher Pilz bildet *Candida albicans* verschiedene morphologische Formen aus. (a) Blastosporen sind rundovale Hefen. (b) Pseudohyphen sind verzweigte Verbände aus ellipsoiden Zellen. Im Gegensatz zu Hyphen befinden sich Einschnürungen zwischen den einzelnen Einheiten. (c) Die weniger stark verzweigten Hyphen bestehen hingegen aus schmalen und tubenförmigen Zellen.

#### 1.2.2.1 Die Immunantwort gegen *Candida albicans*

An der Abwehr von Hefepilzen sind sowohl Anteile des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems beteiligt. Über Dectin-1, Mannose-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage spezifische beta-Glucane und Mannane auf der Oberfläche von *C. albicans* zu erkennen (93, 111-114). Intrazelluläre Pilze werden über Rezeptoren für nukleotidbindende Oligomerisationsdomänen (NOD) erkannt (93). Insbesondere dendritische Zellen und Makrophagen beginnen daraufhin mit der Sekretion entzündungsfördernder Botenstoffe wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  (115-117). IL-12 fördert die Differenzierung naiver T-Lymphozyten zu Th1 Zellen und steigert die Aktivität von NK Zellen, woraufhin beide Zellreihen IFN- $\gamma$  sezernieren (118-120). Hautnerven werden durch *C. albicans* direkt aktiviert und produzieren in der Folge vermehrt den Botenstoff Calcitonin Gene-Related Peptide, welcher dendritische Zellen zur Bildung von IL-23 stimuliert (117, 121, 122). Unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 und des transformierenden Wachstumsfaktors beta differenzieren naive T-Zellen zu IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 produzierenden Th17 Zellen (34, 123). Zusätzlich werden unter dem Einfluss von IL-23 Gamma/delta-T-Zellen zur Synthese von IL-17 angeregt (124). IL-21 verstärkt die Bildung weiterer Th17

Zellen (34). IL-22 fördert die Proliferation von Keratinozyten und stimuliert sie gleichzeitig zur Bildung antimikrobieller Peptide (36, 123). IL-17A und IL-17F stimulieren Epithelzellen, Keratinozyten, Makrophagen und weitere Immunzellen, wodurch sie die Synthese von antimikrobiellen Molekülen und entzündungsfördernden Botenstoffen steigern (34, 123). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen werden durch IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-17F und TNF- $\alpha$  chemotaktisch zum Infektionsherd gelockt. Dort sind sie in der Lage Pilze über Dectin-1 zu erkennen und durch Phagozytose die Infektion zu beenden (34, 117, 125, 126). Th-17 Zellen und die von ihnen produzierten Zytokine sind somit entscheidender Bestandteil in der Immunabwehr von Pilzen. Im Umkehrschluss gehen angeborene genetische Defekte im IL-17 Signalweg mit einer erhöhten Anfälligkeit für lokale und systemische Candidainfektionen einher (78, 79, 127-133).

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Entzündungsreaktion in psoriatischer Haut besitzt große Ähnlichkeiten zu der physiologischen Immunreaktion gegenüber Hefepilzen. Eine Th17-dominierte Hautkrankheit lässt eine erschwerte *Candida* Besiedlung vermuten. Doch trotz der Th17-dominierten Entzündungsreaktion wurde in ersten Berichten bei Psoriasispatienten im Vergleich zur restlichen Bevölkerung eine vergleichbare oder sogar häufigere Besiedelung mit *Candida species* beobachtet (134-139).

Das Ziel dieser Promotionsarbeit bestand erstens in der genauen Untersuchung der Prävalenz von *Candida species* und insbesondere *Candida albicans* bei Patienten mit Psoriasis und der Allgemeinbevölkerung in einer deutschen Kohorte. Hierzu wurde in einer Querschnittstudie systematisch die Prävalenz von *Candida species* auf gesunder Haut, der Mundschleimhaut sowie auf Psoriasisplaques und in Stuhlproben bestimmt.

Zweitens diente diese Promotionsarbeit zur Klärung, ob eine systemische Psoriasisbehandlung und insbesondere die therapeutische Neutralisation von IL-17 zu einer gehäuften Besiedelung mit *Candida species* führt. IL-17A ist ein zentraler Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr gegen *Candida species* und genetische Defekte im TH17/IL-17 Signalweg gehen mit einem vermehrten Auftreten von Candidosen einher (78, 79, 127-133). Gleichzeitig wurde unter Anwendung von IL-17 Antagonisten ein erhöhtes, aber akzeptables, Risiko für Pilzinfektionen beobachtet (69,

70). Zwar muss eine Besiedelung nicht zwangsweise zu einer Candidose führen, aber zumindest in der Theorie besteht für Besiedelte ein erhöhtes Infektionsrisiko.

Bei unklarer Studienlage befasste sich diese Promotionsarbeit drittens mit dem Zusammenhang zwischen Schwere der Psoriasis und der Prävalenz von *Candida species*. Diese Beziehung ist von besonderer Bedeutung, da *Candida species* möglicherweise ebenso wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* Toxine und superantigene Faktoren produzieren und die Entzündung dadurch verstärken beziehungsweise mit auslösen (140-144). Ebenso wird ein molekulares Mimikry zwischen Bestandteilen von  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A und Keratinozytenproteinen diskutiert (145). Eine andere Hypothese ist, dass *Candida species* über eine Aktivierung von Komplementfaktoren neutrophile Granulozyten stimulieren und auf diese Weise eine Psoriasis provozieren können (146). Somit bestände ein kausaler Zusammenhang zwischen Hefepilzen und Krankheitsaktivität. Diese Thesen werden durch Studien gestützt, die zumindest bei einigen Patienten eine Symptomverbesserung unter antimykotischer Therapie nachweisen konnten (147-150).

Sollten *Candida species* die Entzündungsreaktion bei Psoriasis aufrechterhalten oder verschlimmern können, so zeigt sich dies möglicherweise in einer unterschiedlichen Immunreaktion zwischen mit *Candida* besiedelten und nicht besiedelten Patienten. Um diesen Zusammenhang zu klären, wurden viertens Immunzellen von besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten mit *Candida albicans* und Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. Im Anschluss erfolgte eine Quantifizierung der relativen Genexpression der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$  mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qPCR). Aufgrund der großen genetischen Heterogenität innerhalb der Art *Candida albicans* wurden drei unterschiedliche Stämme zur Stimulation verwendet, was zusätzlich Rückschlüsse auf die Immunogenität dieser Stämme erlaubte. Wobei von besonderem Interesse war, ob sich die Virulenz eines unter Therapie mit IL-17 Antagonisten isolierten Stammes durch ebendiese Therapie verändert und in der Folge zu einer veränderten Immunreaktion führt.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Klinische Studie zur *Candida* Besiedlung bei Psoriasis

#### 2.1.1.1 Probandenkollektiv

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte im Zeitraum zwischen dem 21.06.2017 und dem 24.04.2018 und wurde an der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt. Insgesamt wurden 265 Patienten mit Psoriasis für die Psoriasisgruppe und 200 Studienteilnehmer ohne Schuppenflechte für die Kontrollgruppe eingeschlossen (151).

#### 2.1.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Neben dem Vorliegen einer vollständig ausgefüllten und unterschriebenen Einverständniserklärung mussten die Probanden zum Einschlussdatum volljährig und aufklärungsfähig sein. In die Kontrollgruppe wurden Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen sowie Angehörige von Patienten aufgenommen. Diese durften nicht an einer Psoriasis erkrankt sein sowie aktuell keine immunsuppressiven und antimykotischen Medikamente einnehmen. Zum Einschluss in die Gruppe der Psoriasispatienten musste eine diagnostisch gesicherte Psoriasis vorliegen, welche an der Universitäts-Hautklinik Tübingen behandelt wird. Ausschlussgründe waren die anamnestische Einnahme oraler und systemischer Glukokortikoide, eine antimykotische Behandlung sowie die gleichzeitige Teilnahme an einer Medikamentenstudie.

#### 2.1.1.3 Aufklärung

Vor jeder Untersuchung erfolgte eine ca. fünfminütige Aufklärung der Probanden. Zuerst bekamen die Studienteilnehmer eine Patienteninformation und zwei Einverständniserklärungen ausgehändigt. Im Anschluss wurde den Probanden der Aufbau und die Bedeutung der Studie erklärt. Besonders hervorgehoben wurden hierbei die Bedeutung des Datenschutzes, die Freiwilligkeit der Studienteilnahme sowie die Möglichkeit die Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen zu widerrufen. Nach Beantwortung etwaiger weiterführender Fragen wurden die ausgefüllten Einverständniserklärungen von den Studienteilnehmern und einem behandelnden Arzt unterschrieben. Die Durchführung der Studie war von einer Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt worden (Ethikvotum Nummer 758/2016/B02).

## 2.1.2 Proben

### 2.1.2.1 Abstriche

Zum Nachweis einer Besiedelung mit Sprosspilzen erfolgten bei allen Studienteilnehmern Abstriche mit eSwab™ Wattestäbchen. Es wurde jeweils ein Abstrich der Mundschleimhaut und einer von gesunder Haut aus der Achselhöhle durchgeführt. Eine orale Soorinfektion wurde bei keinem Studienteilnehmer beobachtet. Zusätzlich wurde bei 248 Psoriasispatienten mit Hautveränderungen ein Abstrich der Läsion sowie der unmittelbar angrenzenden gesunden Haut genommen.

### 2.1.2.2 Stuhlproben

Zur Untersuchung der Besiedelung des Magendarmtraktes mit Hefepilzen wurden Stuhlproben gesammelt. Die Studienteilnehmer konnten diese mittels einer speziellen Versandbox für medizinische Proben direkt an die Infektionsdermatologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen senden. Auf diese Weise konnten Stuhlproben von 179 Probanden der Psoriasisgruppe und 113 Studienteilnehmern der Kontrollgruppe gesammelt werden (151).

### 2.1.2.3 Blut

Bei 44 Patienten mit Psoriasis wurden zur Untersuchung der Immunantwort auf Sprosspilze fünf 5,5 ml Lithium-Heparin Röhrchen Blut abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte im Anschluss an die routinemäßige Laborkontrolle. Alle Blutentnahmen erfolgten im Zeitraum zwischen dem 29.11.2017 und dem 26.01.2018.

### 2.1.2.4 Probenanalyse

Die Untersuchung der Abstriche und Stuhlproben auf das Vorhandensein von *Candida species* erfolgte durch das Labor der Infektionsdermatologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Die Primärkultivierung der Hefepilze erfolgte bis zu fünf Tage lang bei 28° C auf Sabouraud-Dextrose-Agar. Im Anschluss wurde das Pilzwachstum semiquantitativ bewertet. Dabei wurde zwischen keinem Wachstum,  $\leq 2$  Kolonien,  $> 2$  und  $\leq 5$  Kolonien,  $> 5$  und  $\leq 15$  Kolonien sowie  $> 15$  Kolonien unterschieden. Eine erste Differenzierung erfolgte anhand von Farbe, Textur und mikroskopischer Morphologie. Im Anschluss erfolgte Beurteilung des Wachstumsverhaltens auf ChromID™ CAN2 Agar, Kimmig-Agar und/oder Reis-Agar. Abschließend erfolgte eine Feindifferenzierung der Pilze mit dem Assimilationstest api® 20 C Aux sowie mit verschiedenen Latex-

Agglutinationstesten (Bichro-Dubli FUMOUCZE®, Bichro-Latex Albicans FUMOUCZE®, Glabrata R.T.T. FUMOUCZE® oder Krusei Color FUMOUCZE®).

## 2.2 Laborexperimentelle Untersuchung der Immunantwort auf *Candida spp.*

### 2.2.1 Candidastämme

Innerhalb der Art *Candida albicans* gibt es eine große genetische und phänotypische Diversität (152). Diese Heterogenität zeigt sich in einer unterschiedlich stark ausgeprägten Virulenz, verschiedenen morphologischen Eigenschaften und der durch sie ausgelösten Immunantwort (97, 99, 153-155). Wobei der Isolationsort des Stammes keinen Einfluss auf seine Pathogenität zu haben scheint (97). Auf Grund der Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten wurden drei verschiedene Stämme von *Candida albicans* verwendet.

#### 2.2.1.1 *Candida albicans* SC5314

SC5314 ist ein im Tiermodell hochvirulenter Wildtyp Stamm von *Candida albicans* (156). Er wurde ursprünglich am Department of Dermatology des Columbia College of Physicians and Surgeons in New York City von Margarita Silva-Hunter von einer Patientin mit generalisierter Candidose isoliert (157). SC5314 ist einer der am häufigsten in wissenschaftlichen Experimenten verwendeten Stämme. Die American Type Culture Collection (ATCC®) listet ihn unter dem Kürzel ATCC® MYA-2876.

#### 2.2.1.2 *Candida albicans* Isolat unter lokaler Psoriasis-Therapie (I-LT)

Der zweite verwendete Stamm von *Candida albicans* wurde im Rahmen dieser Studie am 16.08.2017 von der Mundschleimhaut einer 53-jährigen Frau mit Psoriasis isoliert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Patientin mit dem Lokaltherapeutikum Daivonex® behandelt. Im weiteren Verlauf wird dieser unter Lokaltherapie isolierter Wildstamm I-LT genannt.

#### 2.2.1.3 *Candida albicans* Isolat unter Anti-IL-17 Therapie (I-IL-17)

Der dritte Stamm wurde am 18.08.2017 ebenfalls im Rahmen dieser Studie von der Mundschleimhaut eines Psoriasispatienten isoliert. Dieser war zum Isolationszeitpunkt 58 Jahre alt und wurde mit dem Interleukin-17 Antagonisten Ixekizumab therapiert. Im

weiteren Verlauf wird dieser unter Anti-IL-17 Therapie isolierter Wildstamm I-IL-17 genannt.

### 2.2.2 Synchronisation von *Candida albicans*

Die Anzucht und Synchronisation der *Candida albicans* Stämme erfolgte wie bereits von mir publiziert in modifizierter Weise zu der im Jahr 2006 von Schaller et al. beschriebenen Semisynchronisation von Hefezellen (151, 158). Dazu wurden die gefrorenen Hefestämme aufgetaut und auf Sabouraud-Glucose-Agarplatten ausgestrichen. Im Anschluss wurden sie bei 28 °C in einem Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden wurde eine Einzelkolonie mit einer Impföse von der Agarplatte genommen und in 10 ml sterile phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) überführt. Nach sorgfältigem Mischen auf einem Vortexer wurde eine 1/100 Verdünnung in PBS angesetzt und die Zellzahl mit einer Neubauer improved-Zählkammer bestimmt. Im Anschluss wurden  $25 \times 10^6$  Hefezellen in 10 ml Yeast Extract-Peptone-Dextrose Medium (YPD-Medium) suspendiert und für 24 Stunden bei 37°C und 150 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Durch diesen Schritt wurden alle Zellen in dieselbe Wachstumsphase versetzt. Zusätzlich ermöglicht die Temperaturerhöhung auf 37°C die Ausbildung von Hyphen (102). Nach der Synchronisation wurden die Hefen fünf Minuten bei Raumtemperatur und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden dreimal in 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurde eine 1/100 Verdünnung in PBS angefertigt und die Zellzahl wurde erneut mittels einer Neubauer improved-Zählkammer bestimmt. Abschließend wurden die Hefen auf eine Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in PBS eingestellt.

### 2.2.3 Isolation, Stimulation und Ernte peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

PBMCs bestehen größtenteils aus Lymphozyten und Monozyten. Diese Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die menschliche Immunantwort und Abwehr von Krankheitserregern. Die Isolation von PBMCs erfolgte nach der erstmals im Jahr 1968 von Boyum beschriebenen Dichtezentrifugation von Leukozyten aus Blut und Knochenmark (159).

Zur Gewinnung der PBMCs wurden 27,5 ml Lithium-Heparin Blut auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 1/1 mit PBS verdünnt. Im Anschluss wurden jeweils

12 ml Easycoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Easycoll ist eine Trennlösung auf Basis von Polyvinylpyrrolidon beschichteten Silikagel-Partikeln. Da im Laufe dieser Promotionsarbeit die Produktion von Easycoll seitens des Herstellers eingestellt wurde, erfolgte die weitere Isolation der PBMCs aus dem Blut von 30 Patienten mit dem alternativen Trennmedium Biocoll. Biocoll verfügt wie Easycoll über eine Dichte von 1,077 g/ml, jedoch enthält diese Trennlösung Polysucrose an Stelle von Silicagel-Partikeln und es wurden jeweils 15 ml verwendet. Die Trennmedien wurden vorsichtig mit jeweils 27,5 ml des Gemisches aus Blut und PBS überschichtet. Im Anschluss wurden die Röhrchen 30 Minuten lang bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Bremse und Beschleunigung der Zentrifuge wurden dabei auf die niedrigste Stufe gestellt. Erythrozyten und der Großteil der Granulozyten besitzen eine im Vergleich zum Trennmedium höhere Dichte und setzten sich durch die Zentrifugation am Boden des Falcons ab. Die Dichte von Lymphozyten und Monozyten ist hingegen geringer als die der Trennlösung, weshalb sie eine Interphase zwischen Trennmedium und Plasma bildeten und in ein neues Falcon überführt werden konnten. Im Anschluss wurden sie durch Zugabe von 50 ml PBS gewaschen und 5 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 2 ml Ammoniumchlorid-Kalium Lysepuffer (ACK Lysepuffer) resuspendiert. Durch die Zugabe des ACK Lysepuffers wurden etwaige Erythrozyten lysiert. Nach zwei Minuten wurde das Röhrchen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität wurde eine 1/5 Verdünnung von 10 µl Zellsuspension und 40µl 0,2%iger Trypanblaulösung angesetzt. Die Trypanblaulösung wurde zuvor aus gleichen Teilen 0,4%igen Trypanblau und PBS angesetzt. Trypanblau färbt tote Zellen blau an, wodurch diese leicht von den lebendigen Zellen unterschieden werden können. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer improved Zählkammer. Im Anschluss wurde die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  lebendige PBMCs/ml in X-Vivo 15 eingestellt.

Jeweils 1 ml dieser Zelllösung mit  $2 \times 10^6$  PBMCs/ml wurde pro Well einer 24 Well Zellkulturplatte überführt. Pro Patienten gab es fünf verschiedene Ansätze: Einen Kontrollansatz, jeweils einen Ansatz mit den drei zuvor beschriebenen *Candida albicans* Stämmen und einen mit LPS. Dabei verwendeten wir ein vom Hersteller speziell

aufgereinigtes LPS, welches ausschließlich über TLR4 mit Immunzellen interagiert. Zur Erhöhung der späteren Ausbeute an Nukleinsäuren wurde jeder Ansatz in doppelter Ausführung angesetzt. Nach der Inkubation wurden die kongruenten Ansätze zusammengeführt. Jedem Kontrollansatz wurden 25 µl PBS hinzugefügt. Dem zweiten Ansatz wurden 25 µl der Suspension mit dem *Candida albicans* Stamm SC5314 und einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml hinzugegeben. Zu dem dritten Ansatz wurden 25 µl der Hefelösung des *Candida albicans* Isolates unter Lokalthherapie mit einer Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Hefen/ml hinzupipettiert. Dem vierten Ansatz wurden 25 µl der Hefelösung des *Candida albicans* Isolates unter Anti-IL-17 Therapie hinzugefügt. Die Konzentration betrug erneut  $4 \times 10^5$  Hefepilze/ml. Der fünfte Ansatz wurde mit 1 µl LPS mit einer Konzentration von 1 µg/ml versetzt. Zum Volumenausgleich wurden zum Ansatz mit LPS noch 24 µl PBS pipettiert. Somit befanden sich in den drei Ansätzen mit *Candida albicans* jeweils  $10^4$  Hefepilze und in der Positivkontrolle 1 ng LPS. Im Anschluss wurden alle Ansätze für 4 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Überstände der Wells in 1,5 ml Eppendorf-Hütchen überführt und 5 Minuten bei 2500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je 400 µl RNA-Lyse-Puffer T wurden zur Zelllyse in jedes Well pipettiert, wodurch die Zellen lysiert und vorhandene Nukleasen und andere Enzyme inhibiert wurden. Nach Abschaben der adhärennten Zellen am Boden der Wells mit einer Pipettenspitze wurde der Lysepuffer in die Eppendorf-Hütchen überführt und die darin enthaltenen Zellpellets ebenfalls lysiert. Abschließend wurden die Zelllysate bei -80° C eingefroren.

#### 2.2.4 Isolation von RNA

Die Isolation der RNA aus den zuvor lysierten PBMCs erfolgte nach Herstellerangaben mit dem peqGOLD Total RNA Kit. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Dafür wurde zuerst das getaute Zelllysate auf eine DNA Removing Column übertragen und für eine Minute bei 12000 g zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurde die im Lysat enthaltene DNA in der Säule fixiert und zurückgehalten. Nach der Zentrifugation wurde dem Säulendurchfluss 400 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt. Nach dem Mischen auf einem Vortexer wurde das Gemisch auf eine PerfectBind RNA Column geladen und für eine Minute bei 10000 g zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurde die

vorhandene RNA an eine in der Säule enthaltene Silicamembran gebunden. Durch dreimaliges Waschen wurden mögliche Verunreinigungen entfernt. Dazu wurden zunächst 500 µl RNA Wash Buffer I auf die Säule pipettiert und 20 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden 600µl des mit 100%igen Ethanol komplettierten RNA Wash Buffer II auf die Säule pipettiert und 20 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Danach wurde der zweite Waschschrift noch einmal wiederholt und die Probe durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 10000 g getrocknet. Die Elution der nun gereinigten RNA von der Säule erfolgte mit 50 µl nukleasefreiem Wasser und einminütiger Zentrifugation bei 5000 g.

#### 2.2.5 Quantifizierung der RNA

Nach der Isolation wurde die Konzentration der gereinigten RNA mit einem Nanodrop 1000 Spektralphotometer bestimmt. Zur Messung wurden 2µl der RNA-haltigen Lösung verwendet und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge gilt, dass eine Absorptionseinheit einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml entspricht. Die Konzentration der enthaltenden RNA lässt sich somit mit folgender Formel berechnen:

$$\text{RNA} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \text{Absorption bei 260 nm} \times 40$$

#### 2.2.6 Umschrieb von RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Zur späteren Analyse wurde die gewonnene RNA mittels reverser Transkriptase in ihre komplementäre DNA umgeschrieben. Auf diese Weise wurden alle für die Translation von Proteinen enthaltenen messenger Ribonukleinsäuren (mRNA) in ihre jeweils entsprechende cDNA transkribiert. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sowohl RNA als auch DNA als Vorlage verwenden kann. Im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte der Umschrieb mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, wobei zur Erhöhung der Ausbeute an cDNA alle Pipettierschritte auf Eis erfolgten. Zuerst wurden 14 µl der RNA-haltigen Lösung in einem Thermocycler fünf Minuten lang bei 65 °C denaturiert und im Anschluss auf 4 °C heruntergekühlt. Durch diesen Schritt wurden mögliche Sekundärstrukturen der RNA gelöst. Danach wurden 4 µl des 5X Reaction Mix und 2 µl des Maxima Enzyme Mix hinzugefügt. Der 5X Reaction Mix enthält neben Reaktionspuffer auch

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Oligodesoythymidinprimer und random hexamer primer. Der Maxima Enzyme Mix besteht aus reverser Transkriptase und einem Ribonukleaseinhibitor. Im Anschluss erfolgte die Transkription in einem Thermocycler nach dem in Tabelle 2 gezeigtem Schema.

Inkubation	für 10 Minuten bei 25 °C
Reaktion	für 15 Minuten bei 50 °C
Termination	für 5 Minuten bei 85 °C
Abkühlung	auf 4 °C

**Tabelle 1: Ablauf der reversen Transkription**

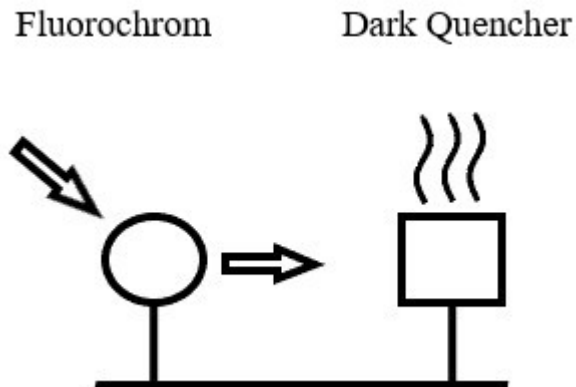
Nach 10-minütiger Vorinkubation erfolgte die Synthese der cDNA durch die reverse Transkriptase bei 50 °C. Durch die abschließende Temperaturerhöhung auf 85 °C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert und die somit Reaktion beendet.

### 2.2.7 qPCR

Die Bestimmung der Zytokinantwort nach Stimulation mit *Candida albicans* und LPS erfolgte mittels qPCR. Dabei wurde die Expression der Botenstoffe IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mit einem LightCycler® 480 Instrument II der Firma Roche untersucht.

Die qPCR basiert auf den Grundlagen der Polymerasen-Kettenreaktion. Durch gleichzeitige Amplifikation und Detektion ermöglicht sie eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression (160, 161). Zur Detektion wurde das TaqMan-Prinzip genutzt. Die TaqMan-Methode basiert auf dem physikalischen Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers. Dabei wird ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt, wodurch er Licht einer anderen ebenfalls definierten Wellenlänge emittiert. Befindet sich jedoch in unmittelbarer Nähe ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff, der ebenfalls durch das von Farbstoff eins emittierte Licht angeregt wird, so wird dieses nicht freigesetzt, sondern als Energie auf das zweite Fluochrom übertragen (162). Der erste Fluoreszenzfarbstoff wird auch als Reporter und der Zweite als Quencher (Löschler) bezeichnet. Der Quencher kann die aufgenommene Energie nun entweder als Licht emittieren oder als Wärmeenergie abgeben. Ein Quencher, der kein Licht ausstrahlt, wird auch als Dark Quencher bezeichnet.





**Abbildung 2: Das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers mit einem Dark Quencher.**

Licht einer definierten Wellenlänge (Pfeil 1) regt ein Fluochrom an, woraufhin dieses Licht einer anderen Wellenlänge (Pfeil 2) emittiert. Der Dark Quencher absorbiert das Licht und wandelt es in Wärmeenergie um.

Bei einer qPCR nach dem TaqMan-Prinzip befinden sich Fluorochrom und Quencher am 5'- und 3'-Ende einer kurzen Nukleotidkette. Dieses markierte Oligonukleotid wird auch als Sonde oder im englischen als Probe bezeichnet. Solange die Sonde intakt ist, wird das vom angeregten Reporter emittierte Licht durch den Quencher absorbiert (161). Wird die Sonde jedoch durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität einer Taq-Polymerase abgebaut, so werden Reporter und Quencher räumlich getrennt und das vom Fluorochrom emittierte Licht kann gemessen werden (162-164). Die hier verwendeten Sonden besaßen am 5'-Ende eine 6-Carboxyfluorescein (6FAM) Markierung als Reporter. Am 3'-Ende befand sich ein BlackBerry® Quencher (BBQ). 6FAM ist ein Fluorochrom das Licht mit einer Wellenlänge von 495 nm absorbiert und mit 517 nm emittiert. BBQ ist ein Dark Quencher.

Zur Durchführung der qPCR wurden neben der Sonde und cDNA zwei Primer, LightCycler® 480 Probes Master und nukleasefreies Wasser verwendet. Primer sind Oligonukleotide, die bei der Vervielfältigung von DNA als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Der Forward-Primer am 3'-Ende einer 3'-5'ausgerichteten cDNA an. Der Reverse-Primer bindet am 3'-Ende einer 5'-3'ausgerichteten cDNA. Die verwendeten Primer und Sonden stammten von TIB Molbiol. Die Sequenzen sind in

Tabelle 4 aufgeführt. Die Taq-Polymerase befand sich im LightCycler® 480 Probes Master der Firma Roche. Pro Ansatz wurden 5 µl LightCycler® 480 Probes Master, 2,5 µl nukleasefreies Wasser, 1 µl cDNA und je 0,5 µl der jeweiligen Primer und Sonde verwendet. Zur Kontrolle wurden immer mindestens Doppelansätze durchgeführt. Die Messung erfolgte in 96-Well PCR-Platten der Biozym Scientific GmbH. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis mit sterilen und nukleasefreien Pipettenspitzen. Im Anschluss wurde die PCR-Platte 5 Minuten bei 4 °C und 400 g zentrifugiert und die Messung im LightCycler® gestartet. Dabei wurden die Proben zuerst 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 60 °C erniedrigt und der erste Replikationszyklus startete. Die Primer und Sonden banden an die cDNA und die Taq-Polymerase startete an den 3'-Enden der Primer mit der Verlängerung des Gegenstranges. Im Zuge der Amplifikation erreichte die Taq-Polymerase die gebundene Sonde und baute diese ab. Reporter und Quencher wurden räumlich getrennt. Nach Vollendung des Gegenstranges und Messung des emittierten Lichts wurde die Temperatur auf 95 °C erhöht, wodurch die zuvor doppelsträngige DNA wieder in Einzelstränge zerfiel. Nach erneutem Abkühlen auf 60 °C lagerten sich neue Primer und Sonden an und der nächste Zyklus startete. Nach der 50. Messung war die Reaktion beendet und der LightCycler® kühlte auf 40 °C ab.

Vorinkubation		10 Minuten bei 95 °C
50 Zyklen	Denaturierung	10 Sekunden bei 95 °C
	Amplifikation	20 Sekunden bei 60 °C mit anschließender Messung
Abkühlung		Auf 40 °C

**Tabelle 2: Ablauf einer quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion mit TaqMan-Sonden im LightCycler®**

Gen		Sequenz
β-Aktin	Forward-Primer	AGCCTCGCCTTTGCCGA
	Reverse-Primer	CTGGTGCCTGGGGCG
	Sonde	6FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCCC-BBQ
Interferon γ	Forward-Primer	GCATCCAAAAGAGTGTGGAG
	Reverse-Primer	GGACATTCAAGTCAGTTACCGA
	Sonde	6FAM-ATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAA -BBQ
Interleukin 17	Forward-Primer	AACCTGAACATCCATAACCGGAA
	Reverse-Primer	GTCCTCATTGCGGTGGAGA
	Sonde	6FAM-CCAATACCAATCCCAAAGGTCTCAGA-BBQ
Interleukin 22	Forward-Primer	TGATGACCTGCATATCCAGAGGAAT
	Reverse-Primer	ATCCAGTTCTCCAATTGCTTTGATC
	Sonde	6FAM-TGCAAAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAA-BBQ
Tumor- nekrose- faktor α	Forward-Primer	CTTCTCCTTCCTGATCGTGGC
	Reverse-Primer	GGGTTTGCTACAACATGGGC
	Sonde	6FAM-CGCCACCACGCTCTTCTGCCT-BBQ

**Tabelle 3: Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden**

6FAM = eine als Reporter dienende 6-Carboxyfluorescein Markierung am 5'Ende der Sonde; A = Adenin; BBQ = ein BlackBerry® Quencher am 3' Ende der Sonde; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin

### 2.2.7.1 Quantifizierung der Zytokinantwort

Zur Quantifizierung musste zunächst der sogenannte crossing point (C<sub>P</sub>-Wert) bestimmt werden. Dieser ist definiert, als der Punkt bei dem die Fluoreszenz des Reporters zum ersten Mal das Hintergrundrauschen überschreitet (165). Die Höhe des C<sub>P</sub>-Wertes ist dabei abhängig von der Expression des untersuchten Zytokins. Ein niedriger C<sub>P</sub>-Wert bedeutet, dass das Zielgen stark exprimiert wurde. Im Umkehrschluss ist der C<sub>P</sub>-Wert bei einer geringen Expression höher.

Zur Quantifizierung wurde jedoch nicht die absolute Menge der untersuchten cDNA bestimmt, sondern deren relative Expression berechnet. Dazu wird die untersuchte Probe in Bezug zu einer unstimulierten Kontrolle gesetzt. Neben der Expression des gesuchten Zytokins wurde zusätzlich der C<sub>P</sub>-Wert des Referenzgenes β-Aktin bestimmt. Das Referenzgen normalisiert die qPCR auf die Menge an RNA, welche bei der reversen Transkription verwendet wurde, und darf daher nicht durch die vorherige Stimulation beeinflusst werden (166). Da bei allen Proben mindestens Doppelansätze durchgeführt wurden, wurde der Mittelwert ihrer C<sub>P</sub>-Werte verwendet. Außerdem wird die Effizienz

der jeweiligen Primer zur Berechnung benötigt. Bei allen im Zuge dieser Studie verwendeten Primern wurde eine Effizienz (E) von E = 2 angenommen. Die relative Expression des Zielgenes wird auf Basis von E und dem Vergleich der C<sub>p</sub>-Werte von β-Aktin und Zytokin bei Kontrolle und Probe nach folgender Formel mit Excel 2016 berechnet (165):

$$relative\ Expression = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{Zielgen}(Kontrolle-Probe)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CP_{Referenzgen}(Kontrolle-Probe)}}$$

### 2.3 Graphische und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Blumenstock vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie des Universitätsklinikums Tübingen. Die mathematische Berechnung erfolgte unter Verwendung der Analysesoftware SPSS Statistics in Version 24.0. Zur graphischen Auswertung der Studienergebnisse wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Die deskriptive Darstellung des Probandenkollektivs erfolgte unter Verwendung von Median und Mittelwert. Der Median wurde zusammen mit dem ersten und dritten Quartil sowie den jeweiligen Minima und Maxima folgendermaßen angeben: Median (1. Quartil – 3. Quartil; Minimum – Maximum). Die Mittelwerte wurden immer mit ± einer Standardabweichung angeben. Die Überprüfung der Studiendaten auf eine bestehende Normalverteilung erfolgte mittels der beiden Lageparameter Schiefe und Kurtosis. Die Schiefe beschreibt dabei die Asymmetrie und die Kurtosis den Wölbungsgrad der untersuchten Verteilung. Beide Parameter sollten zu Annahme einer Normalverteilung zwischen -1 und +1 liegen. Die Signifikanztestung nominaler Daten erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes ( $\chi^2$ ) und des Exakten-Fisher-Testes (FET), wobei der Exakte-Fisher-Test bei einer erwarteten Merkmalshäufigkeit von weniger als fünf verwendet wurde. Zusätzlich wurde bei signifikanten Ergebnissen die Stärke des Zusammenhanges mittels Odds Ratio (OR) mit dem entsprechenden 95 %-Konfidenzintervall (95 %-KI) angeben. Die Berechnung des Signifikanzwertes (P) normalverteilter metrischer Daten erfolgte mittels t-Test. Nicht normalverteilte metrische Daten wurden bei unabhängigen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test (U) und bei verbundenen Stichproben mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Z) auf eine mögliche Signifikanz untersucht. Das Signifikanzniveau betrug in allen Fällen 0,05.

## 2.4 Materialien und Geräte

### 2.4.1 Chemikalien

5x Reaction Mix	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
Agar Nr. 1	Lab M Limited, Lancashire, Vereinigtes Königreich
Biocoll	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
BioWhittaker® ACK Lysepuffer	Lonza, Walkersville, Vereinigte Staaten von Amerika
Difco™ YPD Broth	BD™, Le-Pont-de-Claix, Frankreich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Easycoll	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Ethanol absolute	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Lightcycler® 480 Probes Master	Roche, Mannheim, Deutschland
Lightcycler® 480 Probes Master H <sub>2</sub> O	Roche, Mannheim, Deutschland
LPS-EK-Ultrapur, 1 mg	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Maxima Enzyme Mix	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
qPCR Primer und Sonden für $\beta$ -Aktin, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
RNase freies Wasser	VWR International, Leuven, Belgien
RNA Lysis Buffer T	VWR International, Leuven, Belgien
RNA Wash Buffer I	VWR International, Leuven, Belgien
RNA Wash Buffer II	VWR International, Leuven, Belgien
Sabouraud Agar Lab009	Günter Keul GmbH, Steinfurt, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Gibco® by Life Technologies, Grand Island, Vereinigte Staaten von Amerika
Wasser, nukleasefrei	Thermo Scientific™, Vilnius, Litauen
X-VIVO 15	Lonza, Verviers, Belgien

### 2.4.2 Geräte

Brutschrank Mini Galaxy A	RS Biotech, Irvine, Vereinigtes Königreich
LightCycler® 480 II	Roche, Rotkreuz, Schweiz
Mikroskop LEICA DMIL	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop ZEISS 49056	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Vereinigte Staaten von Amerika
Peqlab advanced Primus 96	VWR International, Leuven, Belgien
Schüttelinkubator INFORS HT Ecotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Vortexer IKA® MS 3 basic	IKA® Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland

Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Megafuge® 16 R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge® 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

### 2.4.3 Verbrauchsmaterialien

5,5 ml Lithium-Heparin Monovetten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
24 Well Cell Culture Cluster	Corning®, Corning, Vereinigte Staaten von Amerika
api© 20 C Aux	bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
Bichro-Latex Albicans FUMOUCHE®	Biosynex SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Bichro-Dubli FUMOUCHE®	Biosynex SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
C-Chip™, Neubauer Improved Disposable Hemocytometer	NanoEnTek Incorporated, Seoul, Südkorea
chromID™ CAN2 Agar	bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
Costar® Stripette™ 10 ml	Corning®, Corning, Vereinigte Staaten von Amerika
eSwab™ Abstriche	Copan Italia SpA, Brescia, Italien
Glabrata R.T.T. FUMOUCHE®	Biosynex SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Kimmig-Agar	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland
Krusei Color FUMOUCHE®	Biosynex SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
PCR 96-Well TW-MT-Platte, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Perfectbind DNA removing columns	VWR International, Erlangen, Deutschland
Perfectbind RNA columns (S-Line)	VWR International, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Volumina	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
qPCR Adhesive Clear Seals	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Reis-Agar	Oxoid, Wesel, Deutschland
Zentrifugenröhrchen mit 15 und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### 3 Ergebnisse

Auszüge aus dieser Promotionsarbeit wurden von mir 2022 unter dem Titel Prevalence of *Candida* species in Psoriasis im Journal *Mycoses* publiziert (151).

#### 3.1 Ergebnisse der klinischen Studie zur Besiedelung mit *Candida spp.* bei Psoriasis

Zum Vergleich der Besiedelung mit *Candida spp.* wurden insgesamt 265 Studienteilnehmer mit Psoriasis und weitere 200 Personen in der Kontrollgruppe untersucht. Die Gruppe der Psoriasispatienten bestand aus 138 Männern (52,1 %) und 127 Frauen (47,9 %) (151). Bei einer Schiefe von  $-0,047$  und einer Kurtosis von  $-0,383$  ist die Altersstruktur der Probanden mit Psoriasis normalverteilt. Das durchschnittliche Alter betrug  $50,21 \pm 13,54$  Jahre. Der Altersmedian lag bei 51 Jahren (41 - 59; 19 - 86). Die Kontrollgruppe besteht aus 102 Männern (51 %) und 98 Frauen (49 %) (151). Die Altersverteilung ist bei einer Schiefe von  $0,033$  und einer Kurtosis von  $-0,796$  normalverteilt. Das Alter in der Kontrollkohorte betrug im Durchschnitt  $50,76 \pm 16,01$  Jahre. Der Altersmedian betrug 51 Jahre (37 - 63,75; 20 - 86) (151). Zwischen Psoriasis Kohorte und der Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Alters- (t-Test;  $P = 0,687$ ) und Geschlechtsunterschied ( $\chi^2$ ,  $P = 0,818$ ).

Von den 265 Probanden mit Psoriasis wurden zwölf (4,5 %) zum Untersuchungszeitpunkt nicht medikamentös behandelt. 27 (10,2 %) Psoriasispatienten erhielten eine rein topische Therapie mit Glukokortikosteroiden und Vitamin D<sub>3</sub>-Analoge. Sechs (2,3 %) Probanden wurden mit systemischen Retinoiden behandelt. Zwölf Patienten (4,5 %) nahmen Apremilast, wobei zwei Teilnehmer Apremilast zusammen mit MTX einnahmen und eine weitere Patientin Apremilast mit dem Dihydroorotat-Dehydrogenase-Hemmstoff Leflunomid kombinierte. 43 (16,2 %) Probanden erhielten Fumarsäureester. 69 (26 %) Patienten wurden mit MTX und weitere 19 (7,2 %) mit einer Kombination aus MTX und TNF-Blockern behandelt. 32 (12,1 %) Probanden erhielten TNF-Blocker in Monotherapie. 26 (9,8 %) Patienten nahmen Ustekinumab, wobei eine Patientin Ustekinumab mit MTX kombinierte. 19 (7,2 %) Studienteilnehmer wurden mit IL-17-Antagonisten behandelt, wobei einer dieser Patienten zusätzlich noch MTX einnahm. Der PASI betrug, sofern bestimmt ( $n = 183$ ), im Median 2 (0,5 - 4; 0 - 14,8), wobei ein PASI

von  $< 1$  in der Berechnung als 0,5 gewertet wurde. 15 Patienten (8,2 %) hatten einen PASI von 0,0 und somit keine sichtbaren Läsionen. 160 Patienten (87,4 %) hatten bei einem PASI von  $> 0$  und  $\leq 10$  eine mild ausgeprägte Psoriasis. Acht Studienteilnehmer (4,4 %) hatten mit einem PASI von  $> 10$  eine mittel- bis schwere Psoriasis (151).

### 3.1.1 Vergleich der Besiedelung mit *Candida species*

Unabhängig von der Lokalisation ließen sich bei 161 (60,8 %) der 265 Psoriasispatienten *Candida species* nachweisen. In der Kontrollgruppe (n = 200) finden sich bei 77 (38,5 %) der Studienteilnehmer *Candida species* (151). Das Wachstumsverhalten von *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten und Kontrollprobanden ist in Tabelle 4 dargestellt. In beiden Gruppen wurde am häufigsten *Candida albicans* isoliert. 110 (41,5 %) der Psoriasispatienten und 58 (29 %) der Studienteilnehmer in der Kontrollgruppe waren mit *Candida albicans* kolonialisiert (151). Die absolute und relative Häufigkeit der verschiedenen Arten der Gattung *Candida*, die bei Psoriasispatienten beziehungsweise in der Kontrollgruppe isoliert wurden, ist in Tabelle 5 aufgelistet. Neben *Candida species* wurden bei einigen Studienteilnehmern auch andere Hefen, Dermatophyten und Schimmelpilze isoliert. Bei zehn (3,8 %) der Psoriasispatienten wurden, nicht zur Gattung *Candida* gehörende, Hefen nachgewiesen (5 x *Saccharomyces cerevisiae*, 2 x *Rhodotorula spp.*, 1 x *Cryptococcus spp.*, 1 x *Trichosporon spp.* und ein nicht näher differenzierbarer Hefepilz). 24 (9,1 %) aller Patienten mit Psoriasis waren mit dem hefeähnlichen Milchsimmel *Geotrichum candidum* besiedelt. Mit Ausnahme von einem Psoriasispatienten ließ sich *Geotrichum candidum* dabei nur in Stuhlproben nachweisen. Zusätzlich wurden in Stuhlproben 2 x *Penicillium spp.* und 2 x nicht näher differenzierbare Schimmelpilze isoliert. Außerdem konnte bei einem (0,4 %) Psoriasispatienten in der Achselhöhle der Dermatophyt *Trichophyton mentagrophytes* nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe wurden bei sechs (3 %) Studienteilnehmern, nicht zur Gattung *Candida* zählende, Sprosspilze nachgewiesen (3 x *Rhodotorula spp.*, 1 x *Cryptococcus humicolus*, 1 x *Kloeckera spp.* sowie ein nicht näher differenzierbarer Hefepilz). Bei weiteren 28 (14 %) Probanden wurde der Milchsimmel *Geotrichum candidum* isoliert (151). Bis auf eine Ausnahme konnte *Geotrichum candidum* auch in der Kontrollgruppe nur im Stuhl nachgewiesen werden.



### Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans*

		kein Wachstum	≤ 2 Kolonien	> 2 und ≤ 5 Kolonien	mehrere Kolonien	reichlich Kolonien
Psoriasispatienten (n = 265)	<i>Candida species</i>	104 (39,2 %)	30 (11,3 %)	14 (5,3 %)	32 (12,1 %)	85 (32,1 %)
	<i>Candida albicans</i>	155 (58,5 %)	13 (4,9 %)	9 (3,4 %)	21 (7,9 %)	67 (25,3 %)
Kontrollgruppe (n = 200)	<i>Candida species</i>	123 (61,5 %)	21 (10,5 %)	7 (3,5 %)	13 (6,5 %)	36 (18 %)
	<i>Candida albicans</i>	142 (71 %)	11 (5,5 %)	5 (2,5 %)	10 (5 %)	32 (16 %)

**Tabelle 4: Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans*.**

Dargestellt ist die Anzahl der kulturell nachgewiesenen Kolonien sowie die absolute und relative Häufigkeit von Psoriasispatienten und Kontrollprobanden mit entsprechendem Wachstum. (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

Species	Psoriasispatienten (n = 265)	Kontrollgruppe (n = 200)
<i>Candida albicans</i> <sup>1,2</sup>	110 (41,5 %)	58 (29 %)
<i>Candida dubliniensis</i> <sup>1,2</sup>	22 (8,3 %)	7 (3,5 %)
<i>Candida famata</i>	1 (0,4 %)	0
<i>Candida glabrata</i> <sup>1,2</sup>	19 (7,2 %)	6 (3 %)
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (0,4 %)	0
<i>Candida intermedia</i>	1 (0,4 %)	0
<i>Candida krusei</i> <sup>1</sup>	3 (1,1 %)	1 (0,5 %)
<i>Candida lambica</i>	1 (0,4 %)	0
<i>Candida lipolytica</i> <sup>1</sup>	1 (0,4 %)	0
<i>Candida parapsilosis</i> <sup>1,2</sup>	3 (1,1 %)	2 (1 %)
<i>Candida sphaerica</i>	1 (0,4 %)	0
<i>Candida species</i> <sup>1,2</sup>	24 (9,1 %)	11 (5,5 %)
<i>Candida tropicalis</i> <sup>1</sup>	2 (0,8 %)	0
<i>Candida zeylanoides</i>	1 (0,4 %)	0

**Tabelle 5: Die einzelnen isolierten Arten der Gattung *Candida*.**

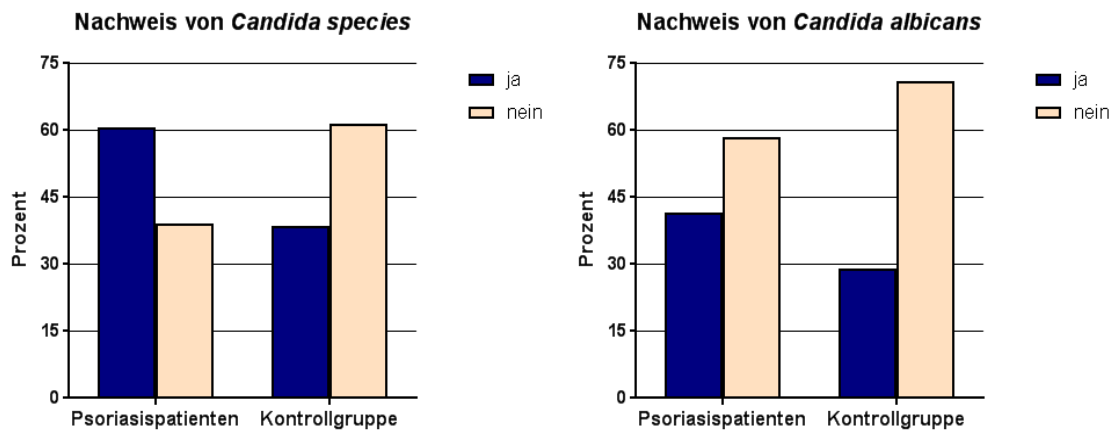
Gezeigt ist die absolute und relative Häufigkeit der verschiedenen *Candida (C.) species*, die bei Psoriasispatienten und in der Kontrollgruppe isoliert wurden. Nicht näher differenzierbare Hefen

der Gattung *Candida* sind in der Gruppe *Candida species* zusammengefasst. (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

<sup>1</sup> Zehn Psoriasispatienten waren gleichzeitig mit *C. albicans* und *C. glabrata* besiedelt. Bei weiteren fünf wurden gleichzeitig *C. albicans* und *C. species* isoliert. Drei waren mit *C. albicans* und *C. dubliniensis* besiedelt. Bei jeweils einem Probanden wurden *C. albicans* und *C. krusei*, *C. albicans* und *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* und *C. glabrata*, *C. dubliniensis* und *C. lipolytica*, *C. glabrata* und *C. species*, *C. krusei* und *C. species* beziehungsweise *C. parapsilosis* und *C. species* nachgewiesen. Zwei Psoriasispatienten waren mit drei verschiedenen Pilzen der Gattung *Candida* kolonialisiert. Bei Einem wurden *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. glabrata* isoliert. Der Andere war mit *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* besiedelt.

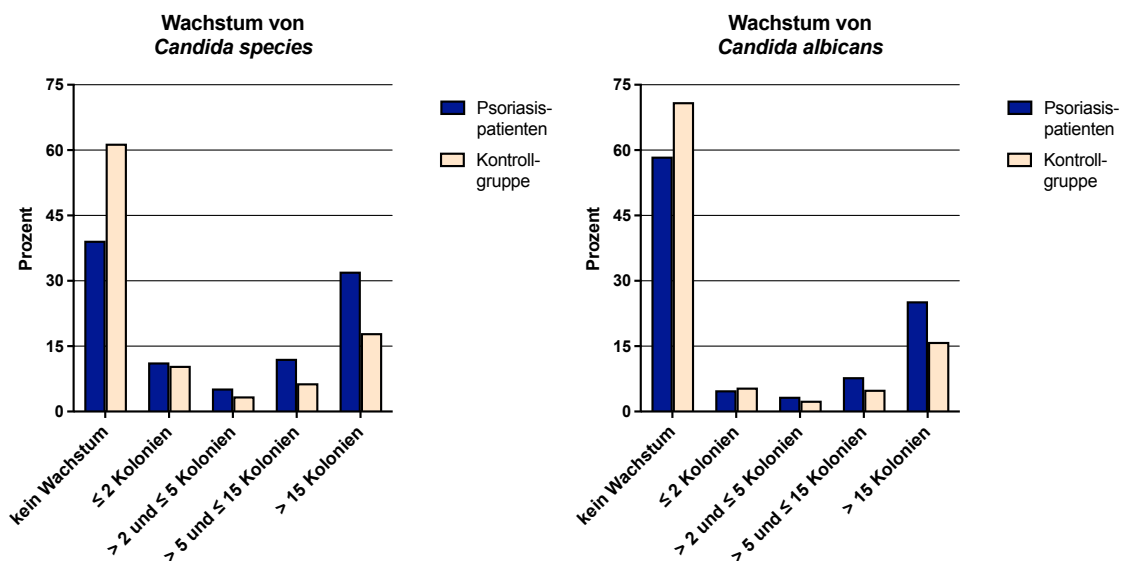
<sup>2</sup> In der Kontrollgruppe wurden bei je drei Studienteilnehmern *C. albicans* und *C. glabrata* beziehungsweise *C. albicans* und *C. species* nachgewiesen. Zwei Probanden waren mit *C. albicans* und *C. dubliniensis* besiedelt. Bei Einem wurde *C. albicans* und *C. parapsilosis* isoliert.

Vergleicht man unabhängig vom Probenmaterial die Besiedelung mit *Candida species*, so finden sich bei 161 (60,8 %) der Psoriasispatienten (n = 265) und 77 (38,5 %) der Kontrollprobanden (n = 200) Hefen der Gattung *Candida*. Dieser Unterschied zeigt sich auch statistisch in einer signifikant (P = < 0,001) häufigeren Besiedelung von Psoriasispatienten. Für Psoriasispatienten beträgt das OR einer Besiedelung 2,47 (95 %-KI: 1,68 – 3,6) (151). *Candida albicans* findet sich bei 110 (41,5 %) der Psoriasispatienten und 58 (29 %) der Probanden in der Kontrollgruppe. Psoriasispatienten sind dabei ebenfalls signifikant (P = 0,005) häufiger kolonialisiert. Nach dem OR hatten Psoriasispatienten eine 1,74-fach (95 %-KI: 1,18 – 2,57) erhöhte Chance für eine Besiedelung mit *Candida albicans*. Neben der reinen Besiedelung unterscheiden sich die beiden Gruppen auch in der Anzahl der Hefekolonien, die auf den Agarplatten wuchsen. Dabei findet sich bei Psoriasispatienten ein signifikant ( $\chi^2$ ; P = < 0,001) stärkeres Wachstum von *Candida species*. Das Wachstumsverhalten von *Candida albicans* unterscheidet sich hingegen nicht signifikant ( $\chi^2$ ; P = 0,053).



**Abbildung 3: Nachweis von *Candida species* und *Candida albicans***

Dargestellt ist die relative Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten und in der Kontrollgruppe. Studienteilnehmer mit Psoriasis sind dabei signifikant häufiger mit *Candida species* ( $P = < 0,001$ ) und *Candida albicans* ( $P = 0,005$ ) besiedelt als Probanden der Kontrollgruppe. (Die entsprechenden Daten sowie die Graphik Nachweis von *Candida species* finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)



**Abbildung 4: Das Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans***

Abgebildet ist das relative Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten und Kontrollprobanden. Bei Psoriasispatienten findet sich ein signifikant ( $P = < 0,001$ ) stärkeres Wachstum von *Candida species*. Das Wachstumsverhalten von *Candida albicans* unterscheidet sich hingegen nicht signifikant ( $P = 0,053$ ) zwischen den beiden Gruppen.

### 3.1.1.1 Die Besiedelung mit *Candida species* auf Psoriasisplaques und in der Achselhöhle

Abstriche von Plaques wurden nur bei Psoriasispatienten mit sichtbaren Läsionen genommen. Dabei konnten aus vier (1,6 %) der 248 Abstriche *Candida species* isoliert werden (151). Bei drei (1,2 %) Probanden fanden sich dabei je eine Kolonie und bei einem (0,4 %) Studienteilnehmer wenige Kolonien. *Candida albicans* (1 Kolonie) wurde bei einem Probanden nachgewiesen. Darüber hinaus war ein weiterer Proband mit *Cryptococcus spp.* besiedelt.

Aus Abstrichen der Achselhöhle konnten ebenfalls nur bei sehr wenigen Studienteilnehmern Hefepilze nachgewiesen werden. Insgesamt fanden sich bei vier (1,5 %) der 265 Psoriasispatienten und zwei (1 %) der 200 Kontrollprobanden *Candida species*. Zwischen beiden Gruppen gibt es dabei keine statistischen Unterschiede (FET;  $P = 0,704$ ) (151). Mit *Candida albicans* waren drei (1,1 %) Psoriasispatienten und ein (0,5 %) Proband der Kontrollgruppe besiedelt.

**Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* aus Abstrichen der Achselhöhle**

		kein Wachstum	≤ 2 Kolonien	> 2 und ≤ 5 Kolonien	mehrere Kolonien	reichlich Kolonien
Psoriasispatienten (n = 265)	<i>Candida species</i>	261 (98,5 %)	1 (0,4 %)	2 (0,8 %)	0 (0 %)	1 (0,4 %)
	<i>Candida albicans</i>	262 (98,9 %)	1 (0,4 %)	2 (0,8 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Kontrollgruppe (n = 200)	<i>Candida species</i>	198 (99 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
	<i>Candida albicans</i>	199 (99,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)

**Tabelle 6: Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* aus Abstrichen der Achselhöhle**

Dargestellt ist die Anzahl der kulturell nachgewiesenen Kolonien sowie die absolute und relative Häufigkeit von Psoriasispatienten und Kontrollprobanden mit entsprechendem Wachstum. (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

### 3.1.1.2 Die Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* im Mundraum

In der Mundhöhle fanden sich bei 125 (47,2 %) der Psoriasispatienten (n = 265) Hefepilze der Gattung *Candida*, wobei *Candida albicans* die häufigste Species war. In der Kontrollgruppe (n = 200) sind 40 (20 %) der Studienteilnehmer besiedelt. *Candida albicans* war hier ebenfalls der am häufigsten nachgewiesene Pilz. Die beiden Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant ( $\chi^2$ ; P = < 0,001) hinsichtlich der Besiedelung mit *Candida species*. Nach dem OR hatten Psoriasispatienten dabei eine 3,57-fach (95 %-KI: 2,34 – 5,45) erhöhte Chance einer Besiedelung. *Candida albicans* findet sich bei 88 (33,2 %) der Psoriasispatienten und 30 (15 %) der Kontrollprobanden. Psoriasispatienten sind dabei wiederum signifikant ( $\chi^2$ ; P = < 0,001) häufiger besiedelt und haben nach dem OR eine 2,82-fach (95 %-KI: 1,77 – 4,48) erhöhte Chance in der Mundhöhle mit *Candida albicans* besiedelt zu sein (151).

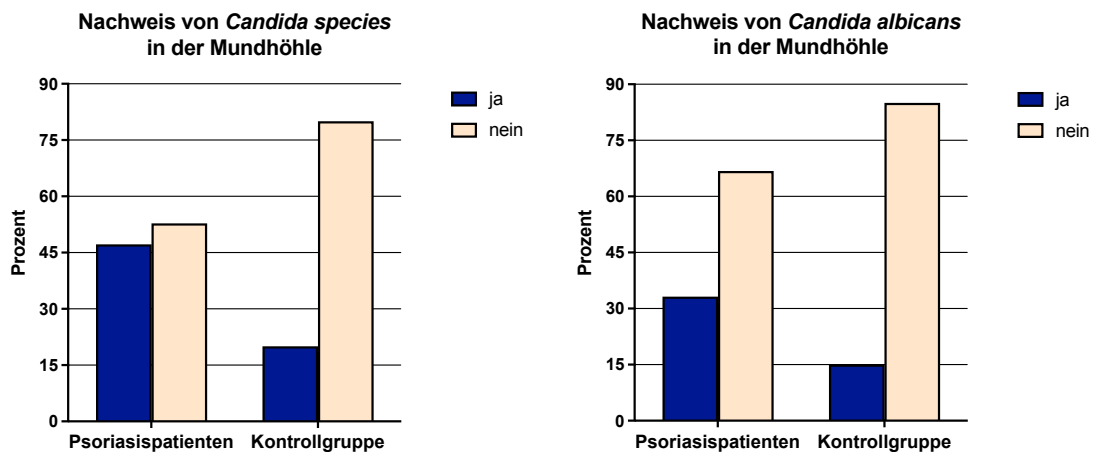
**Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* aus Abstrichen der Mundschleimhaut**

		kein Wachstum	≤ 2 Kolonien	> 2 und ≤ 5 Kolonien	mehrere Kolonien	reichlich Kolonien
Psoriasispatienten (n = 265)	<i>Candida species</i>	140 (52,8 %)	37 (14 %)	17 (6,4 %)	26 (9,8 %)	45 (17 %)
	<i>Candida albicans</i>	177 (66,8 %)	20 (7,5 %)	11 (4,2 %)	24 (9,1 %)	33 (12,5 %)
Kontrollgruppe (n = 200)	<i>Candida species</i>	160 (80 %)	23 (11,5 %)	8 (4 %)	7 (3,5 %)	2 (1 %)
	<i>Candida albicans</i>	170 (85 %)	16 (8 %)	7 (3,5 %)	6 (3 %)	1 (0,5 %)

**Tabelle 7: Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* aus Abstrichen der Mundschleimhaut**

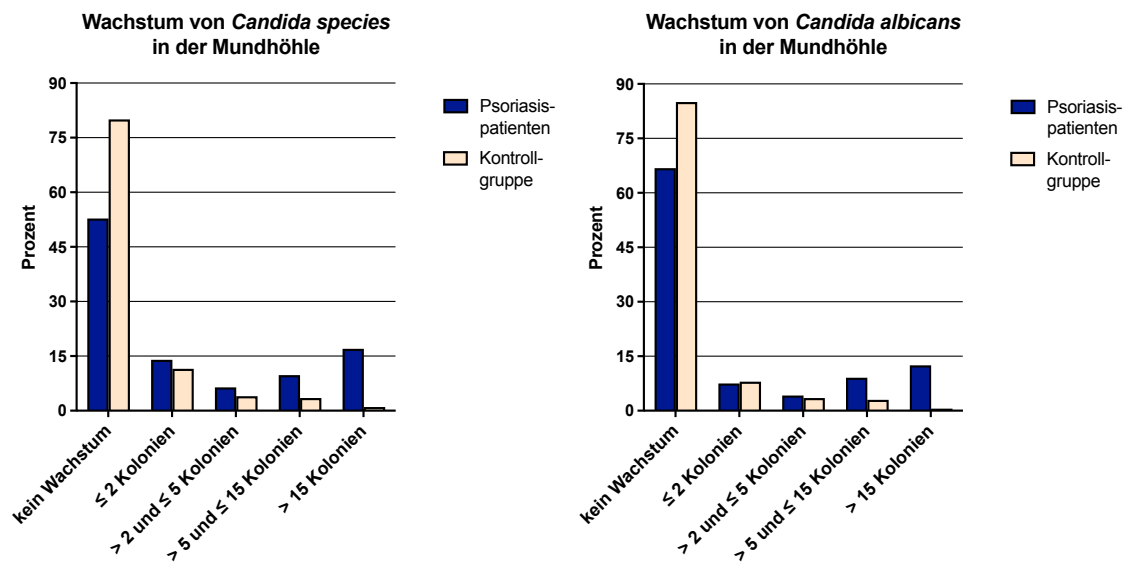
Dargestellt ist die Anzahl der kulturell nachgewiesenen Kolonien sowie die absolute und relative Häufigkeit von Psoriasispatienten und Kontrollprobanden mit entsprechendem Wachstum. (Die entsprechenden Daten finden sich in Auszügen und in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

Vergleicht man die Psoriasis Kohorte und die Kontrollprobanden hinsichtlich der Anzahl an kulturell aus Mundschleimhautabstrichen nachgewiesenen Kolonien, so findet sich bei Psoriasispatienten ein signifikant stärkeres Wachstum von *Candida species* (FET;  $P = < 0,001$ ) und *Candida albicans* (FET;  $P = < 0,001$ ).



**Abbildung 5: Nachweis von *Candida species* und *Candida albicans* in der Mundhöhle**

Abgebildet ist die relative Häufigkeit einer oralen Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten und in der Kontrollgruppe. In der Mundhöhle sind Studienteilnehmer mit Psoriasis signifikant häufiger mit *Candida species* ( $P = < 0,001$ ) und *Candida albicans* ( $P = < 0,001$ ) besiedelt als Probanden der Kontrollkohorte. (Die entsprechenden Daten sowie die Graphik Nachweis von *Candida species* in der Mundhöhle finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)



**Abbildung 6: Das Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* in der Mundhöhle**

Dargestellt ist das relative Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten und Kontrollprobanden. In der Mundhöhle findet sich bei Psoriasispatienten ein signifikant stärkeres Wachstum von *Candida species* ( $P = < 0,001$ ) und *Candida albicans* ( $P = < 0,001$ ).

### 3.1.1.3 Nachweis von *Candida species* und *Candida albicans* in Stuhlproben

179 Psoriasispatienten und 113 der Kontrollprobanden waren bereit im Rahmen dieser Studie Stuhlproben zu Verfügung zu stellen. In 102 (57 %) der Stuhlproben, die von Psoriasispatienten abgegeben wurden, sind *Candida species* nachweisbar. *Candida albicans* wurde hierbei am häufigsten isoliert. In der Kontrollgruppe fanden sich Vertreter der Gattung *Candida* in 48 (42,5 %) der Proben, wobei *Candida albicans* ebenfalls die häufigste Species war. Statistisch zeigt sich hierbei eine signifikant ( $\chi^2$ ;  $P = 0,016$ ) häufigere Besiedelung des Stuhls mit *Candida species* bei Probanden mit Psoriasis. Nach dem OR hatten Psoriasispatienten ein 1,79-fach (95 %-KI: 1,11 – 2,89) höheres Risiko mit *Candida* besiedelt zu sein (151). *Candida albicans* findet sich bei 74 (41,3 %) Psoriasispatienten und 39 (34,5 %) Kontrollprobanden im Stuhl. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $\chi^2$ ;  $P = 0,243$ ). Darüber hinaus zeigte sich in der Kontrollgruppe eine signifikant ( $\chi^2$ ;  $P = 0,015$ ) häufigere Besiedelung mit dem hefeähnlichen Pilz *Geotrichum candidum*. Bei insgesamt 23 (12,8%) Psoriasispatienten und 27 (23,9 %) Kontrollprobanden konnte dieser Milchsimmel aus Stuhlproben isoliert werden. Angehörige der Kontrollgruppe hatten dabei nach dem OR ein 1,52-fach

(95 %-KI: 1,12 – 2,07) höheres Risiko im Stuhl mit *Geotrichum candidum* besiedelt zu sein.

**Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* in Stuhlproben**

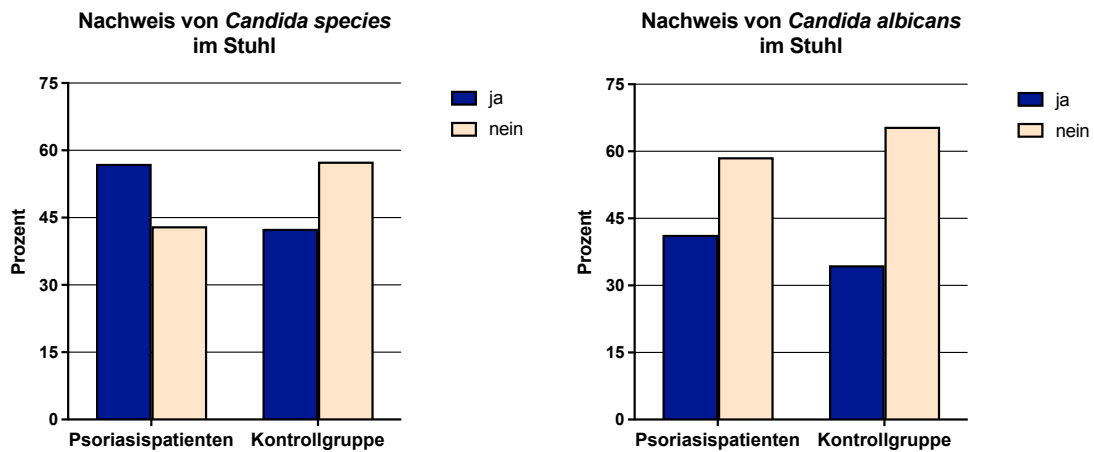
		kein Wachstum	≤ 2 Kolonien	> 2 und ≤ 5 Kolonien	mehrere Kolonien	reichlich Kolonien
Psoriasispatienten (n = 179)	<i>Candida species</i>	77 (43,1 %)	8 (4,5 %)	6 (3,4 %)	24 (13,4 %)	64 (35,8 %)
	<i>Candida albicans</i>	105 (58,7 %)	4 (2,2 %)	5 (2,8 %)	15 (8,4 %)	50 (27,9 %)
Kontrollgruppe (n = 113)	<i>Candida species</i>	65 (57,5 %)	4 (3,5%)	3 (2,7 %)	7 (6,2 %)	34 (30,1 %)
	<i>Candida albicans</i>	74 (65,5 %)	1 (0,9 %)	1 (0,9 %)	6 (5,3 %)	31 (27,4 %)

**Tabelle 8: Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* in Stuhlproben**

Gezeigt ist die Anzahl der kulturell nachgewiesenen Kolonien sowie die absolute und relative Häufigkeit von Psoriasispatienten und Kontrollprobanden mit entsprechendem Wachstum. (Die entsprechenden Daten finden sich in Auszügen und in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

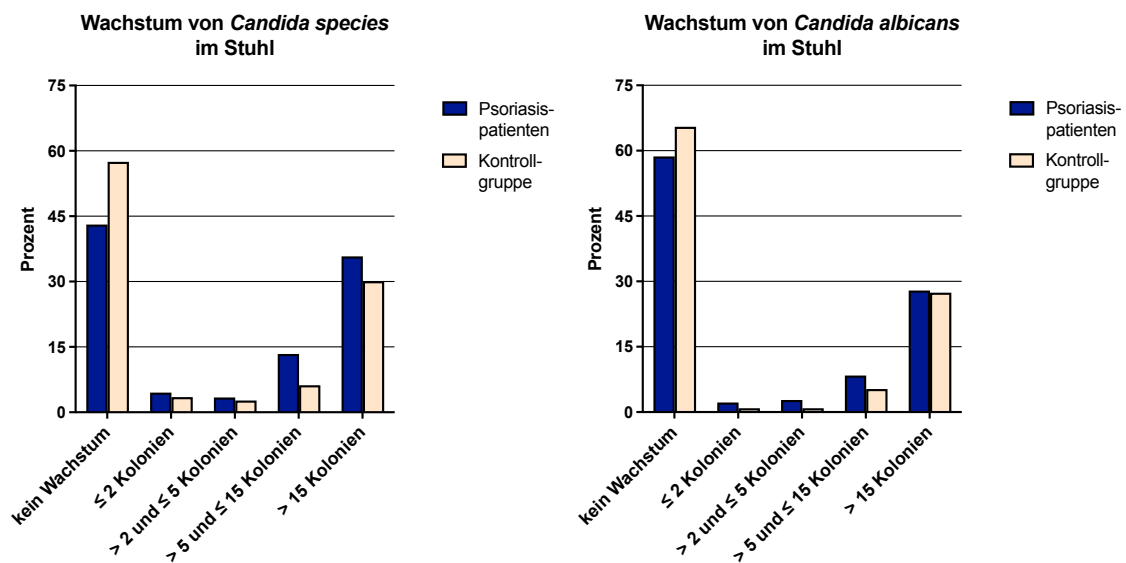
Hinsichtlich der Anzahl an kulturell nachgewiesenen *Candida* Kolonien findet sich kein Unterschied (FET, P = 0,119). Betrachtet man nur das Wachstumsverhalten von *Candida albicans*, so unterscheiden sich die beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant voneinander (FET, P = 0,568).





**Abbildung 7: Nachweis von *Candida species* und *Candida albicans* im Stuhl**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten und Kontrollprobanden. Studienteilnehmer mit Psoriasis sind hierbei signifikant häufiger mit *Candida species* besiedelt ( $P = 0,016$ ). Beim Nachweis von *Candida albicans* finden sich hingegen keine statistisch messbaren Unterschiede ( $P = 0,243$ ). (Die entsprechenden Daten sowie die Graphik Nachweis von *Candida species* im Stuhl finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)



**Abbildung 8: Das Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* in Stuhlproben**

Gezeigt ist das relative Wachstum von *Candida species* und *Candida albicans* aus Stuhlproben bei Psoriasispatienten und Kontrollprobanden. Dabei ist zwischen beiden Gruppen kein Unterschied hinsichtlich des Wachstumsverhalten von *Candida species* ( $P = 0,119$ ) beziehungsweise *Candida albicans* ( $P = 0,568$ ) messbar.

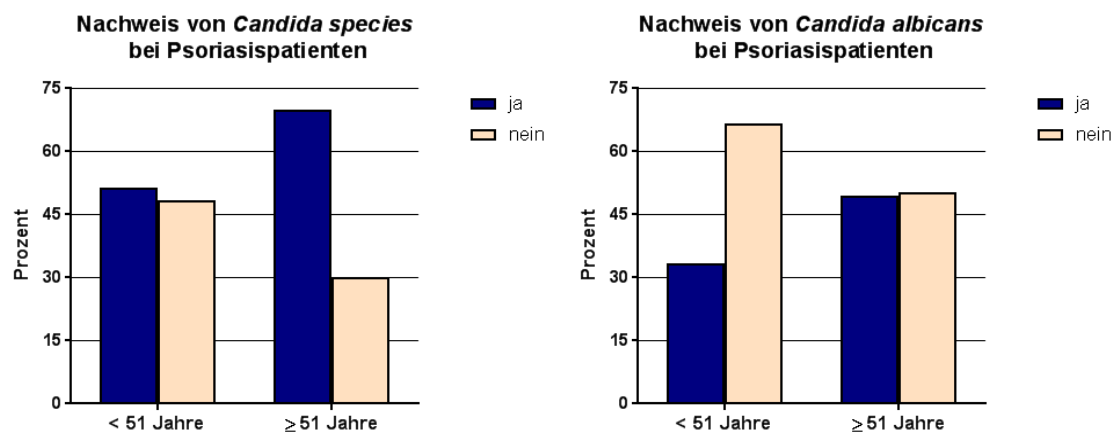
### 3.1.2 Die Auswirkungen von Alter, Geschlecht, Therapie und Schweregrad der Psoriasis auf die Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans*

Der Altersmedian der insgesamt 465 Studienteilnehmer beträgt 51 Jahre (40 - 60; 19 - 86). Die 265 Psoriasispatienten sind dabei im Median 51 Jahre (41 - 59; 19 - 86) alt. Bei den 200 Probanden der Kontrollkohorte liegt das mediane Alter ebenfalls bei 51 Jahren (37 - 63,75; 20 - 86). Bei Betrachtung aller 465 Studienteilnehmer und Dichotomisierung am Altersmedian finden sich *Candida species* bei 96 (41,6 %) der Personen < 51 Jahre und bei 142 (60,7 %) der Testpersonen mit 51 oder mehr Jahren. *Candida albicans* ließ sich bei 66 (28,6 %) Probanden mit weniger als 51 Jahren und bei 102 (43,6 %) Studienteilnehmern  $\geq$  51 Jahre nachweisen. Hierbei zeigt sich eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2$ ,  $P = < 0,001$ ) und *Candida albicans* ( $\chi^2$ ,  $P = 0,001$ ) bei älteren Studienteilnehmern. Studienteilnehmer mit 51 oder mehr Lebensjahren hatten nach dem OR ein 2,17-fach (95 %-KI: 1,5 - 3,14) höheres Risiko mit *Candida species* und ein 1,93-fach (95 %-KI: 1,31 - 2,84) höheres Risiko mit *Candida albicans* besiedelt zu sein. Im Gegenzug hatten Probanden < 51 Jahre eine 0,46-fach (95 %-KI: 0,32 - 0,67) geringere Chance für eine Besiedelung mit *Candida species* und eine 0,52-fach (95 %-KI: 0,35 - 0,76) niedrigere Chance mit *Candida albicans* besiedelt zu sein.

In der Psoriasis Kohorte sind 68 (51,5 %) der < 51 Jahre alten Patienten und 93 (69,9 %) der Probanden mit 51 oder mehr Jahren mit *Candida species* besiedelt. *Candida albicans* findet sich bei 44 (33,3 %) der Studienteilnehmer mit < 51 Jahren und bei 66 (49,6 %) der Testpersonen mit  $\geq$  51 Jahren. Es zeigt sich hierbei eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2 = 9,42$ ,  $P = 0,002$ ) und *Candida albicans* ( $\chi^2 = 7,24$ ,  $P = 0,007$ ) bei Probanden mit 51 oder mehr Lebensjahren. Ältere Studienteilnehmer hatten nach dem OR ein 2,19-fach (95 %-KI: 1,32 - 3,62) höheres Risiko mit *Candida species* und eine 1,97-fach (95 %-KI: 1,2 - 3,24) größere Chance mit *Candida albicans* besiedelt zu sein. Im Gegenzug hatten jüngere Probanden eine 0,46-fach (95 %-KI: 0,28 - 0,76) geringere Chance für eine Besiedelung mit *Candida species* und eine 0,51-fach (95 %-KI: 0,31 - 0,83) geringere Chance für eine Besiedelung mit *Candida albicans* (151).

In der Kontrollgruppe konnten Hefepilze der Gattung *Candida* bei 28 (28,3 %) der unter 51 Jahre alten Studienteilnehmer und 49 (48,5 %) der Probanden mit 51 oder mehr

Lebensjahren isoliert werden. *Candida albicans* fand sich bei 22 (22,2 %) der Testpersonen < 51 Jahre und bei 36 (35,6 %) der Studienteilnehmer  $\geq$  51 Jahre. Es lässt sich hierbei eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2 = 8,64$ ,  $P = 0,003$ ) und *Candida albicans* ( $\chi^2 = 4,37$ ,  $P = 0,036$ ) bei älteren Probanden nachweisen. Ältere Kontrollpersonen hatten nach dem OR eine 2,39-fach (95 %-KI: 1,33 – 4,29) größere Chance mit *Candida species* und eine 1,94-fach (95 %-KI: 1,04 – 3,62) größere Chance mit *Candida albicans* besiedelt zu sein. Jüngere Kontrollprobanden hatten hingegen eine 0,42-fach (95 %-KI: 0,23 – 0,75) niedrigere Chance einer Besiedelung mit *Candida species* und eine 0,52-fach (95 %-KI: 0,28 – 0,96) niedrigere Chance für eine Besiedelung mit *Candida albicans* (151).



**Abbildung 9: Nachweis von *Candida species* und *Candida albicans* in Abhängigkeit vom Alter**

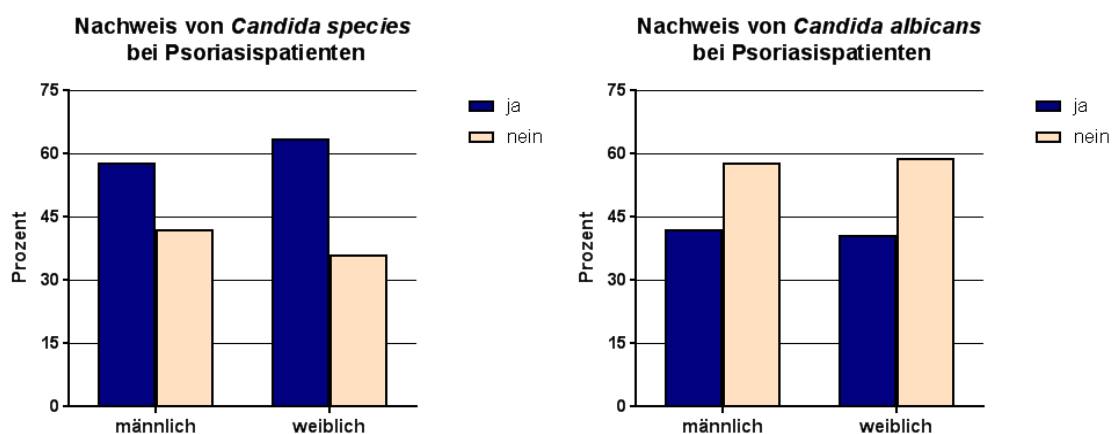
Dargestellt ist die relative Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* bei Psoriasispatienten nach Dichotomisierung am Altersmedian (51 Jahre). Hierbei zeigt sich eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* ( $P = 0,002$ ) und *Candida albicans* ( $P = 0,007$ ) bei älteren Probanden. (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

Von allen 465, im Rahmen dieser Studie untersuchten, Probanden sind 240 (51,6 %) männlich und 225 (48,4 %) weiblich. *Candida species* fanden sich bei 120 (50 %) männlichen und 118 (52,4 %) weiblichen Studienteilnehmern. *Candida albicans* konnte bei 87 (36,3 %) Männern und 81 (36 %) Frauen nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich zwischen den Geschlechtern kein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufigkeit

einer Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2$ , P = 0,598) und *Candida albicans* ( $\chi^2$ , P = 0,955).

In der Psoriasis Kohorte sind 138 (52,1 %) Probanden männlich und 127 (47,9 %) weiblich. Hefepilze der Gattung *Candida* fanden sich bei 80 (58 %) Männern und 81 (63,8 %) Frauen. *Candida albicans* konnte bei 58 (42 %) männlichen und 52 (40,9 %) weiblichen Probanden isoliert werden. Es lässt sich hierbei zwischen Männern und Frauen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2$ , P = 0,333) und *Candida albicans* ( $\chi^2$ , P = 0,858) feststellen (151).

Die Kontrollgruppe besteht aus 102 (51 %) Männern und 98 (49 %) Frauen. Von den männlichen Kontrollprobanden sind 40 (39,2 %) mit *Candida species* und 29 (28,4 %) mit *Candida albicans* besiedelt. Bei den Frauen konnten *Candida species* in 37 (37,8 %) und *Candida albicans* in 29 (29,6 %) Fällen isoliert werden. Zwischen den beiden Geschlechtern findet sich in Bezug auf die Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2$ , P = 0,832) und *Candida albicans* ( $\chi^2$ , P = 0,857) kein signifikanter Unterschied (151).



**Abbildung 10: Nachweis von *Candida species* und *Candida albicans* in Abhängigkeit vom Geschlecht**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* bei männlichen und weiblichen Psoriasispatienten. Dabei zeigt sich zwischen Männern und Frauen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* (P = 0,333) beziehungsweise *Candida albicans* (P = 0,858). (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

39 Studienteilnehmer wurden zum Einschlussdatum rein topisch oder überhaupt nicht medikamentös behandelt. Bei diesen nicht systemisch therapierten Psoriasispatienten ließen sich in 25 (64,1 %) Fällen *Candida species* nachweisen. Von den übrigen 226 systemisch behandelten Probanden sind 136 (60,2 %) mit *Candida species* besiedelt. Zwischen beiden Gruppen findet sich dabei kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2$ , P = 0,643) (151). Ebenso findet sich kein signifikanter Unterschied (FET, P = 0,226) zwischen den 12 nicht medikamentös behandelten Studienteilnehmern und den übrigen 253 Probanden und auch kein signifikanter Unterschied (FET, P = 0,236) zwischen den unbehandelten und den systemisch behandelten Probanden.

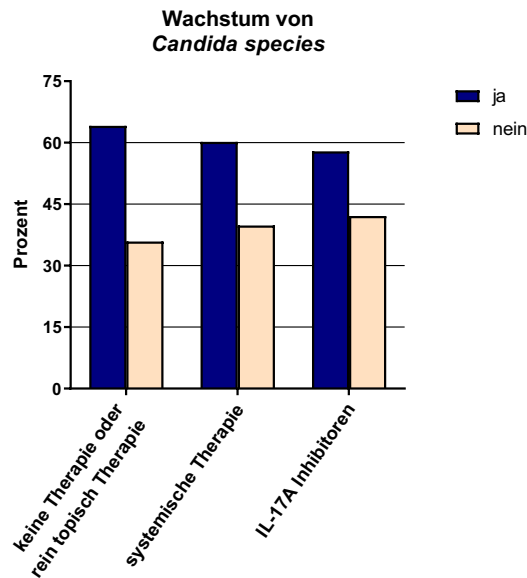
Von den 19 Psoriasispatienten, die mit IL-17A Inhibitoren behandelt wurden, sind 11 (57,9 %) mit *Candida species* besiedelt. Bei den restlichen 246 Patienten ließen sich in 150 (61 %) Fällen *Candida species* isolieren. Die Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* unterscheidet sich hierbei nicht signifikant ( $\chi^2$ , P = 0,791). Verglichen mit den Studienteilnehmern, die keine oder nur eine rein lokale Behandlung erhielten, zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz von *Candida species* ( $\chi^2$ , P = 0,647) (151). Und auch bei Vergleich mit den nicht medikamentös behandelten Probanden findet sich kein statistisch relevanter Unterschied ( $\chi^2$ , P = 0,379).

Auf eine weitere Subgruppenanalyse wurde auf Grund der Gefahr von statistischen Verzerrungen durch multiple Signifikanztestungen verzichtet.

<b>Therapie</b>	<b>Nachweis von <i>Candida species</i></b>	<b>Kein Nachweis von <i>Candida species</i></b>
keine (n = 12)	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)
reine Lokaltherapie (n = 27)	20 (74,1 %)	7 (25,9 %)
Apremilast (n = 12)	7 (58,3 %)	5 (41,7 %)
Fumarsäureester (n = 43)	24 (55,8 %)	19 (44,2 %)
Retinoide (n = 6)	2 (33,3 %)	4 (66,7 %)
Methotrexat (n = 69)	44 (63,8 %)	25 (36,2 %)
Methotrexat + TNF-Blocker (n = 19)	14 (73,7 %)	5 (26,3 %)
TNF-Blocker (n = 32)	19 (59,4 %)	13 (40,6 %)
IL-17-Antagonisten (n = 19)	11 (57,9 %)	8 (42,1 %)
Ustekinumab (n = 26)	15 (57,7 %)	11 (42,3 %)

**Tabelle 9: Nachweis von *Candida species* in Abhängigkeit zur Therapie**

Dargestellt ist für jede Therapie die absolute und relative Anzahl der besiedelten und nicht besiedelten Probanden. Unbehandelte sowie Patienten unter Retinoidtherapie waren hierbei überwiegend nicht mit Hefen besiedelt. Bei den anderen Therapieformen war die Mehrheit mit *Candida species* besiedelt. (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)



**Abbildung 11: Nachweis von *Candida species* in Abhängigkeit zur Therapie**

Abgebildet ist die prozentuale Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* bei Psoriasispatienten. Die erste Gruppe besteht aus 39 Probanden, die zum Einschlussdatum nicht oder nur rein lokal behandelt wurden. Die zweite Gruppe enthält alle 226 systemisch behandelten Patienten. Die dritte Gruppe beinhaltet 19 Probanden, welche mit IL-17A Inhibitoren behandelt wurden. Dabei zeigte im Vergleich zu den nicht beziehungsweise nur topisch behandelten Patienten kein statistisch signifikanter Unterschied in der Besiedelung mit *Candida species* bei Patienten unter systemischer Psoriasisstherapie ( $P = 0,643$ ) und bei Patienten unter Therapie mit IL-17A Inhibitoren ( $P = 0,647$ ). (Die entsprechenden Daten finden sich in modifizierter Darstellung in Referenz 151.)

Bei insgesamt 183 Psoriasispatienten wurde der PASI erhoben. Davon hatten 15 Probanden (8,2 %) einen PASI von 0 und weitere 160 Studienteilnehmer (87,4 %) einen PASI von  $> 0$  und  $\leq 10$ . Acht (4,4 %) Personen hatten einen PASI von  $> 10$ . Von den Studienteilnehmern mit einem PASI von 0 waren neun (60 %) mit *Candida species* besiedelt. Bei Psoriasispatienten mit einem PASI von  $> 0$  und  $\leq 10$  waren in 93 (58,1 %) Fällen *Candida species* nachweisbar. Von den Studienteilnehmern mit einem PASI  $> 10$  waren 5 (62,5 %) kolonialisiert. Somit hatten insgesamt 168 Probanden einen PASI von

> 0. Von diesen 168 Probanden waren wiederum 93 (58,3 %) mit *Candida species* besiedelt. Bei Vergleich der Patienten mit einem PASI von 0 mit den Studienteilnehmern mit einem PASI von > 0 findet sich hierbei kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* ( $\chi^2$ , P = 0,9).

Insgesamt 175 Probanden hatten einen PASI von  $\leq 10$ , wobei 102 (58,3 %) mit *Candida species* kolonialisiert waren. Zwischen den Psoriasispatienten mit einem PASI von  $\leq 10$  und denen mit einem PASI von > 10 besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* (FET, P = 1) (151).

### 3.2 Die Untersuchung der *Candida* Immunantwort *in vitro*

In experimentellen *In-vitro*-Untersuchungen haben wir die Immunantwort von 20 mit *Candida species* besiedelten sowie 24 nicht besiedelten Psoriasispatienten gegenübergestellt, um zu untersuchen, ob eine Besiedelung mit *Candida* Einfluss auf die Immunantwort von Psoriasispatienten hat. Dazu wurden isolierte PBMCs mit LPS bzw. drei verschiedenen Stämmen von *Candida albicans* stimuliert. Hierzu wurden drei *Candida* Stämme, der Laborstamm SC5314, der zuvor von einer Psoriasispatienten unter Lokalthherapie isolierte Wildstamm I-LT sowie der ebenfalls im Rahmen dieser Promotionsarbeit von einem Psoriasispatienten unter Behandlung mit einem IL-17 Antagonisten isolierte Stamm I-IL-17 zur Stimulation von PBMC verwendet. Im Anschluss wurde die relative Genexpression der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, und TNF- $\alpha$  in den PBMC mittels qPCR bestimmt (151).

Während die Stimulation mit LPS eine Kontrolle der Aktivierbarkeit der PBMCs darstellt, hat uns der Vergleich der Immunantwort von besiedelten und nicht besiedelten Probanden durch die drei verschiedenen Stämme (SC5314, I-LT und I-IL-17) interessiert. Dabei betrachteten wir insbesondere, ob sich die Virulenz des unter Therapie mit einem IL-17 Antagonisten isolierten *Candida* Stammes (I-IL-17) durch ebendiese Therapie verändert wurde und in der Folge eine veränderte Immunantwort verursachte.

Von den 20 Psoriasispatienten, bei denen *Candida species* nachgewiesen wurden, waren 14 männlich (70 %) und sechs weiblich (30 %). Ihr durchschnittliches Alter betrug  $51,25 \pm 11,88$  Jahre. Der Altersmedian betrug 51,5 Jahre (44,75 – 59; 19 - 68). Soweit aus der

Dokumentation ersichtlich (n = 16) betrug der PASI im Median 2,75 (1 -5,15; 0 – 13). Jeweils ein Proband (5 %) wurde mit Fumarsäureester, einem IL-17 Antagonisten, mit Ustekinumab oder rein lokal behandelt. Ein weiterer Proband erhielt keine psoriasispezifische Therapie und eine anderer nahm Apremilast in Kombination mit MTX. Sieben Patienten (35 %) wurden mit TNF-Blockern behandelt. Drei Patienten (15 %) erhielte eine Kombinationsbehandlung mit MTX und TNF-Blockern. Die restlichen vier Teilnehmer (20 %) wurden mit MTX allein behandelt. 16 Psoriasispatienten (36,4 %) waren mit *Candida albicans* besiedelt, wobei bei vieren (9,1 %) zusätzlich *Candida glabrata* und bei einem (2,3 %) zusätzlich *Candida dubliniensis* nachgewiesen wurde. Zwei Studienteilnehmer (4,5 %) waren mit *Candida dubliniensis* besiedelt. Bei einem weiteren Probanden (2,3 %) wurden *Candida dubliniensis* und *Candida lipolytica* nachgewiesen. Bei einem Patienten (2,3 %) wurde *Candida zeylanoides* isoliert.

Von den 24 Psoriasispatienten, die nicht mit *Candida species* besiedelt waren, sind acht (33,3 %) männlich und 16 (66,7 %) weiblich. Im Durchschnitt waren sie  $45,04 \pm 13,46$  Jahre alt. Ihr Altersmedian lag bei 44,5 Jahren (33,75 – 56,25; 24 - 78). Sofern erhoben (n = 15) betrug ihr PASI im Median 1 (0,2 -3,4; 0 – 6). Ein Patient (4,2 %) wurde mit Fumarsäureestern und ein weiterer mit einem IL-17 Antagonisten behandelt. Jeweils zwei Patienten (8,3 %) erhielten MTX in Kombination mit einem TNF-Blocker, Retinoide oder gar keine Therapie. Weitere zwei Probanden (8,3 %) erhielten Apremilast, wobei eine Patientin zusätzlich Leflunomid einnahm. Vier Studienteilnehmer (16,7 %) nahmen Ustekinumab. Fünf Patienten (20,8 %) wurden mit MTX allein behandelt und weitere fünf Probanden (20,8 %) erhielten TNF-Blocker.

### 3.2.1 Vergleich der Zytokinantwort bei Patienten mit und ohne Besiedelung von *Candida species*

Die Stimulation mit LPS als Kontrolle, aber vor alle auch mit allen drei *Candida* Stämmen (SC5314, I-IL-17 und I-LT) führte zu einer Aktivierung der isolierten PBMC von Psoriasispatienten – unabhängig von ihrem *Candida*-Besiedlungsstauts - mit entsprechender Expression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$ . Im Folgenden finden sich die detaillierten Analysen.

Nach Stimulation mit dem Laborstamm SC5314 ergab sich kein signifikanter Unterschied in der PBMC Genexpression von IFN- $\gamma$  (U, P = 0,141), IL-17 (U, P = 0,58), IL-22 (U, P

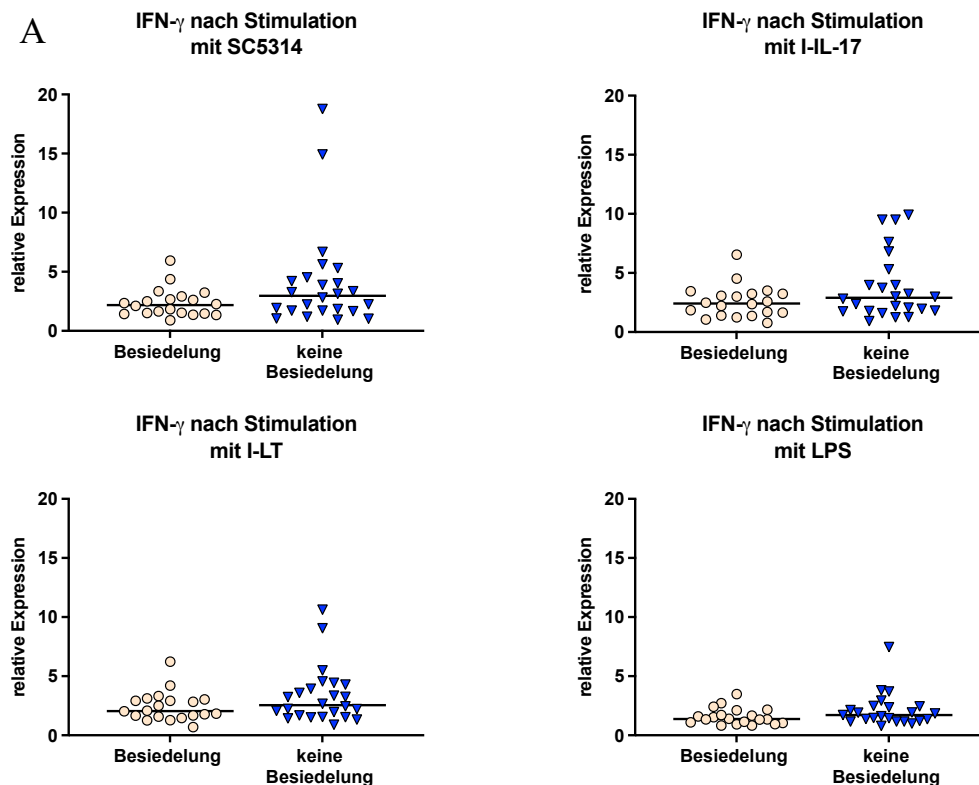


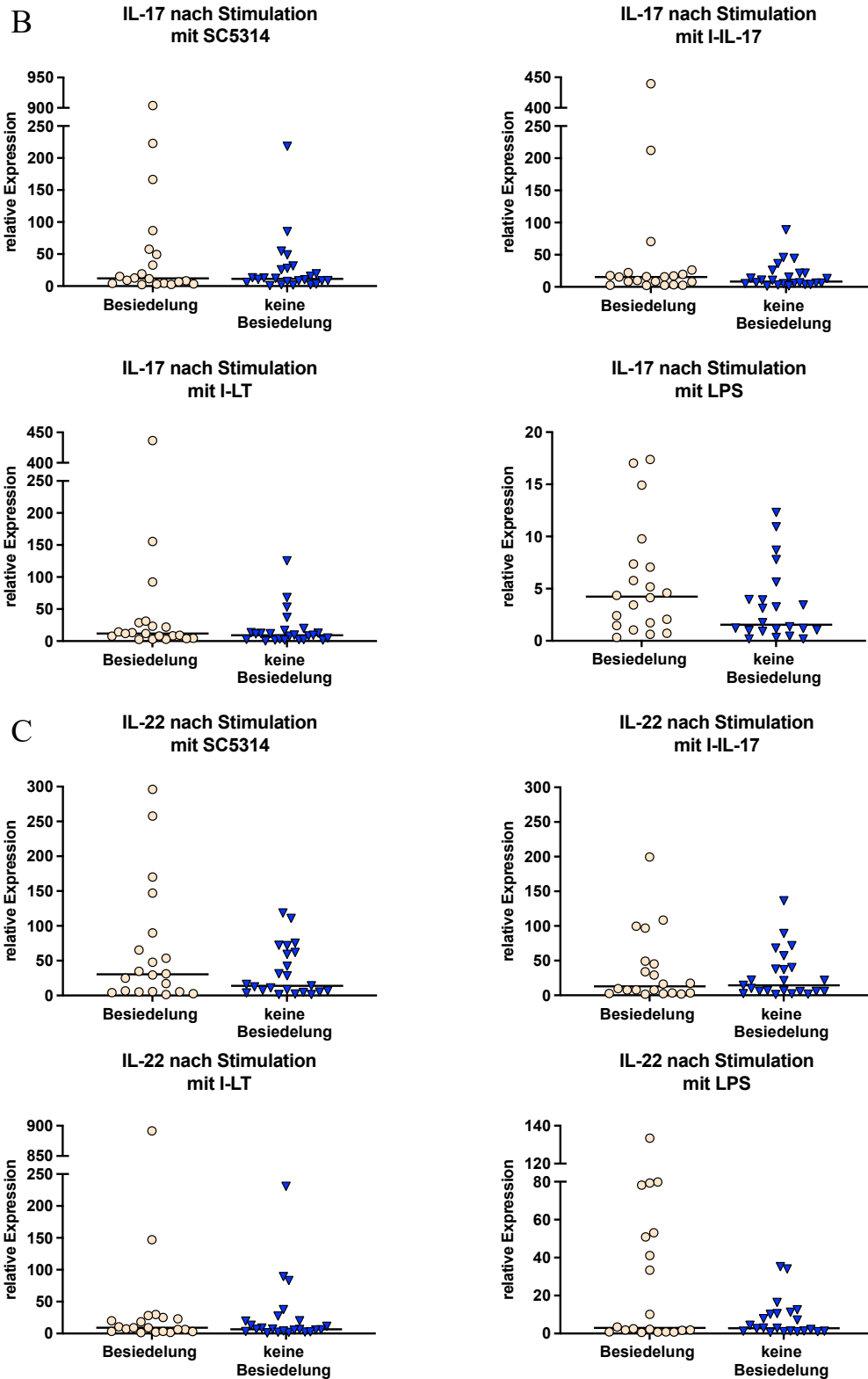
= 0,387), und TNF- $\alpha$  (U, P = 0,823) zwischen mit *Candida species* besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten (151).

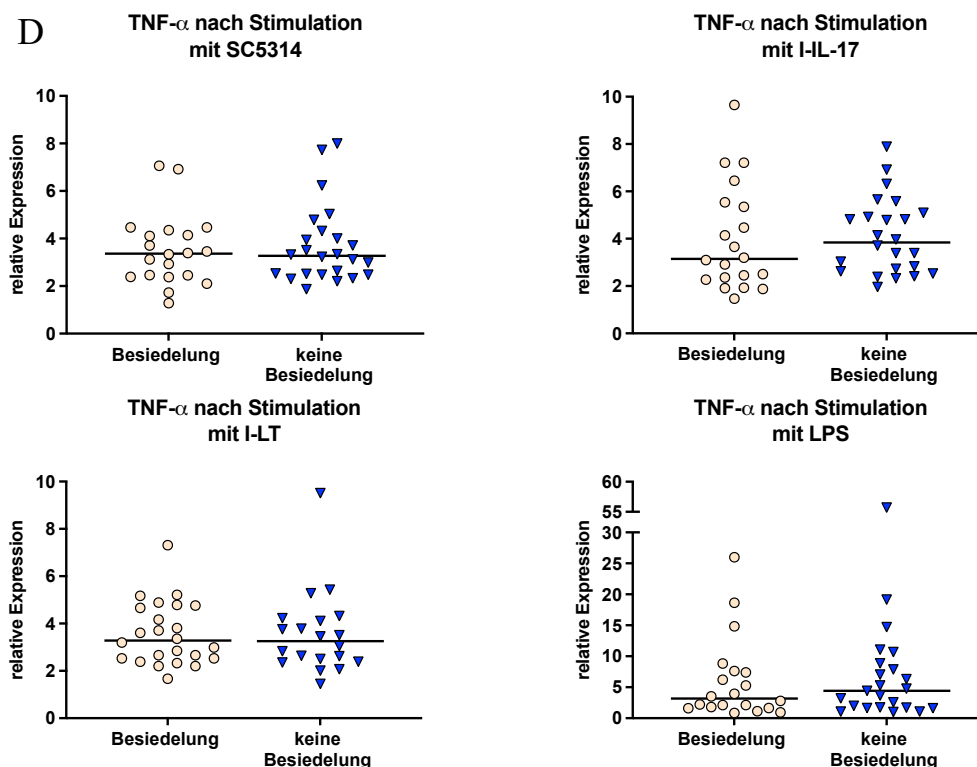
Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Besiedelten und nicht Besiedelten in der IFN- $\gamma$  (U, P = 0,238), IL-17 (U, P = 0,465), IL-22 (U, P = 0,827), und TNF- $\alpha$  (U, P = 0,458) Antwort nach Stimulation mit dem *Candida albicans* Stamm I-IL-17.

Nach Stimulation mit dem dritten *Candida albicans* Stamm I-LT fand sich zwischen den beiden Gruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von IFN- $\gamma$  (U, P = 0,207), IL-17 (U, P = 0,203), IL-22 (U, P = 0,618), und TNF- $\alpha$  (U, P = 0,897).

Nach Stimulation mit LPS konnte wie erwartet eine Aktivierung der Zytokinexpression in den PBMC nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von IFN- $\gamma$  (U, P = 0,113), IL-17 (U, P = 0,104), IL-22 (U, P = 0,473), und TNF- $\alpha$  (U, P = 0,661) zwischen mit *Candida species* besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten (151).







**Abbildung 12: Vergleich der Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, und TNF- $\alpha$  bei Psoriasispatienten mit und ohne Besiedelung von *Candida species***

Abgebildet ist die relative Expression der Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (A), Interleukin-17 (IL-17) (B), Interleukin-22 (IL-22) (C) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (D) in isolierten PBMC von mit *Candida species* besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten nach der jeweiligen Stimulation. Nach jeweils vierstündiger Inkubation mit Lipopolysacchariden (LPS), dem *Candida albicans* Laborstamm SC5314 sowie den isolierten Stämmen I-IL-17 beziehungsweise I-LT zeigen sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$ . (Die entsprechenden Daten und Graphen finden sich in Auszügen und in modifizierter Darstellung in Referenz 151 zu finden.)

### 3.2.2 Vergleich der Immunreaktion auf unterschiedliche *Candida albicans* Stämme

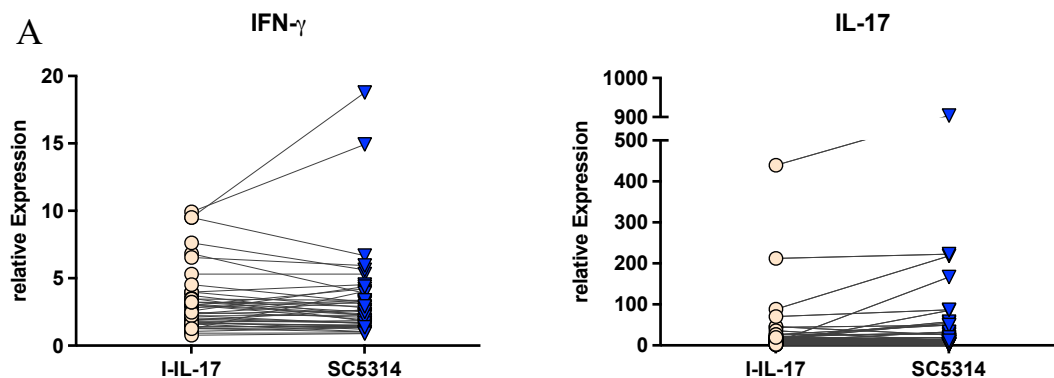
Neben dem Vergleich der Zytokinantwort von Psoriasispatienten mit und ohne Besiedelung von *Candida species* wurde untersucht, ob verschiedene Stämme von *Candida albicans* unterschiedlich starke Immunreaktionen bei jeweils demselben Patienten (unabhängig davon, ob mit *Candida* besiedelt oder nicht) hervorrufen. Dazu wurden der Laborstamm SC5314 sowie die Wildstämme I-IL-17 und I-LT im Hinblick auf die durch sie ausgelöste Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$  in PBMC

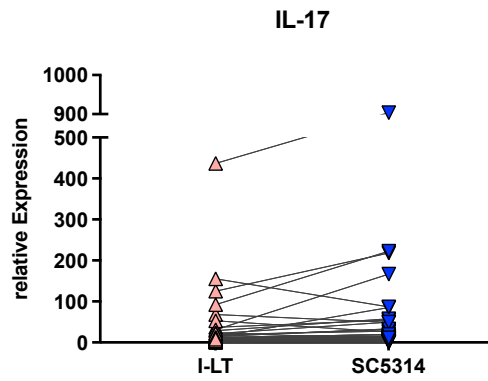
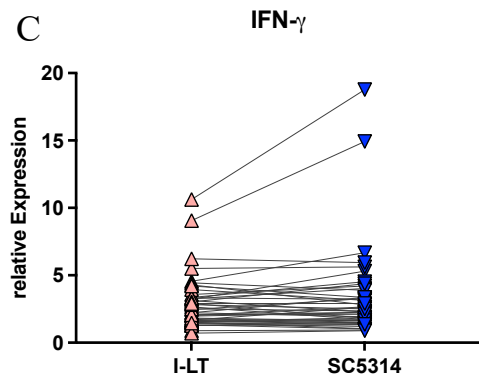
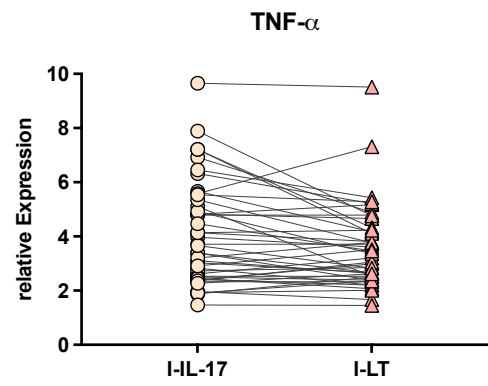
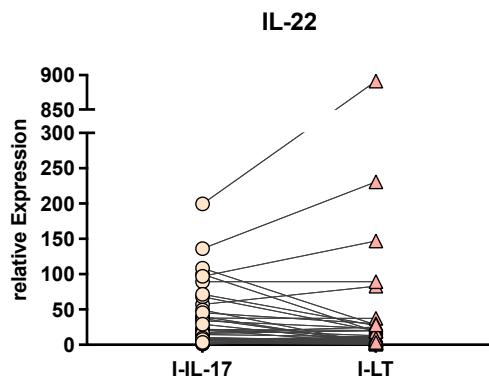
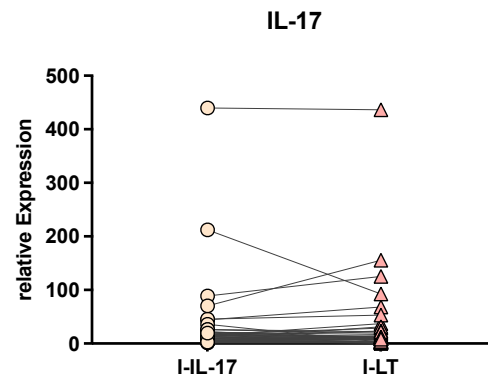
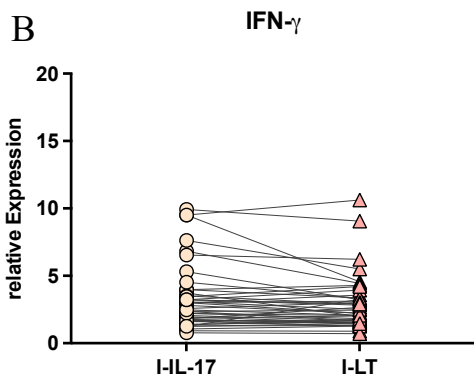
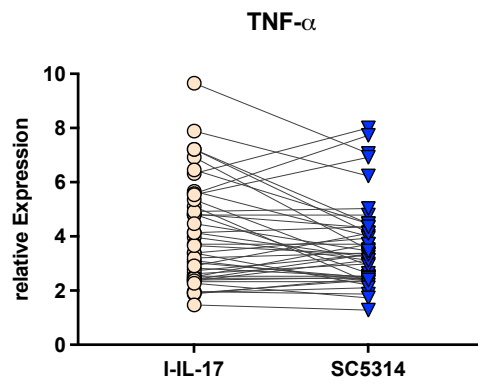
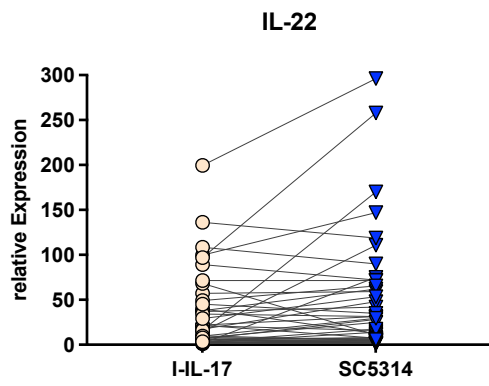
verglichen. Von besonderem Interesse war hierbei, ob sich die Virulenz des unter Therapie mit einem IL-17 Antagonisten isolierten Stammes I-IL-17 durch ebendiese Therapie verändert und somit zu einer veränderten Immunantwort führt.

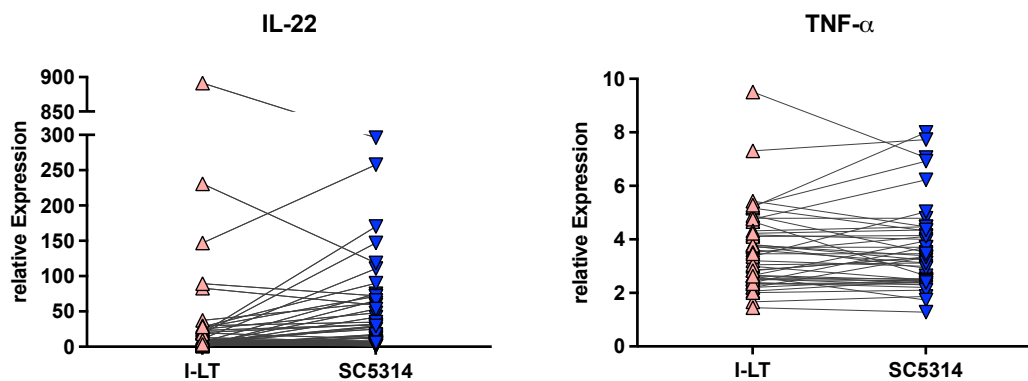
Hierbei zeigte sich nach Stimulation mit I-IL-17 im Vergleich zu einer Stimulation mit SC5314 eine signifikant schwächere IL-17 (Z, P = 0,025) Antwort. Die Genexpression von IFN- $\gamma$  (Z, P = 0,196), IL-22 (Z, P = 0,065) und TNF- $\alpha$  (Z, P = 0,604) unterschied sich hingegen nicht signifikant.

Bei Vergleich der durch I-IL-17 und I-LT hervorgerufenen Zytokinantworten zeigte sich hingegen nach Stimulation mit I-IL-17 eine signifikant stärkere Genexpression von TNF- $\alpha$  (Z, P = 0,009), bei nicht signifikant veränderter Expression von IFN- $\gamma$  (Z, P = 0,052), IL-17 (Z, P = 0,944) und IL-22 (Z, P = 0,258)

Nach Stimulation mit SC5314 zeigte sich im Vergleich zu einer Stimulation dem Stamm I-LT eine signifikant stärkere Genexpression der Zytokine IL-17 (Z, P = 0,011) und IL-22 (Z, P = 0,014). Im Hinblick auf die Expression von IFN- $\gamma$  (Z, P = 0,514) und TNF- $\alpha$  (Z, P = 0,115) fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.







**Abbildung 13: Vergleich der Immunreaktion auf unterschiedliche *Candida albicans* Stämme bei Psoriasispatienten**

Abgebildet ist die relative Expression der Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-17 (IL-17), Interleukin-22 (IL-22) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nach Stimulation mit den *Candida* Stämmen I-IL-17 (gelb), I-LT (pink) und SC5314 (blau). Verglichen wurde, ob eine Stimulation mit unterschiedlichen *Candida* Stämmen bei PBMC von an Psoriasis erkrankten Patienten unterschiedliche Zytokinantworten ausgelöst werden. Messergebnisse von gleichen Patienten sind dabei mit Linien verbunden.

Abschnitt A vergleicht die Immunreaktion auf I-IL-17 im Vergleich zu der Reaktion auf SC5314. Hierbei zeigt sich nach Stimulation mit I-IL-17 eine signifikant schwächere Genexpression von IL-17 im Vergleich zu einer Stimulation mit SC5314, bei nicht signifikant veränderter Expression von IFN- $\gamma$ , IL-22 und TNF- $\alpha$ .

Gleichzeitig zeigt sich in Abschnitt B nach Stimulation mit I-IL-17 eine im Vergleich zu einer Stimulation mit I-LT signifikant stärker Expression von TNF- $\alpha$ , wobei sich in der Zytokinexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17 und IL-17 keine signifikanten Unterschiede nachweisen lassen.

Abschnitt C vergleicht die Immunantwort auf I-LT im Vergleich zu einer Stimulation mit SC5314. Hierbei findet sich nach Stimulation mit SC5314 eine signifikant stärkere Expression der Zytokine IL-17 und IL-22, bei nicht signifikant veränderter Expression von IFN- $\gamma$ , IL-22 und TNF- $\alpha$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Prävalenz von *Candida species* in der Normalbevölkerung und bei Psoriasispatienten

Zur Bestimmung der Prävalenz von *Candida species* wurden 265 Psoriasispatienten und 200 Kontrollprobanden rekrutiert. Dabei fand sich bei Patienten mit Psoriasis eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species*, wobei Psoriasispatienten ein 2,5-fach größeres Risiko hatten mit *Candida* besiedelt zu sein. Insgesamt waren in dieser Arbeit 60,8 % der Psoriasispatienten und 38,5 % der Kontrollprobanden mit Hefen der Gattung *Candida* besiedelt. *Candida albicans* war in beiden Gruppen der mit Abstand am häufigsten isolierte Pilz, wobei Psoriasispatienten auch signifikant häufiger mit *Candida albicans* besiedelt waren. Insgesamt wurde dieser Hefepilz bei 41,5 % der Psoriasispatienten und 29 % der Kontrollpersonen nachgewiesen. Dies entspricht 68,3 % von allen mit *Candida* besiedelten Psoriasispatienten und 75,3 % der besiedelten Kontrollprobanden. Darüber hinaus konnten bei Psoriasispatienten mehr unterschiedliche Arten der Gattung *Candida* nachgewiesen werden. Psoriasispatienten waren somit nicht nur häufiger, sondern auch mit mehr unterschiedlichen Arten besiedelt (151).

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit vorherigen Untersuchungen, die ebenfalls eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* bei Psoriasispatienten fanden und bei 20 bis 78 % der Psoriasispatienten eine Besiedelung mit *Candida species* nachweisen konnten (134, 136-139). Darüber hinaus wiesen Leibovici et al. eine nicht signifikante, aber dennoch im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Besiedelung von Psoriasispatienten nach (135). In den entsprechenden Kontrollgruppen lag die Prävalenz zwischen 2,8 und 50 % (134-139). Zum Teil wurde dabei ebenfalls eine größere Vielfalt an unterschiedlichen *Candida* Arten bei Psoriasispatienten beobachtet (136, 137). In allen Studien wurde, ebenso wie in dieser Promotionsarbeit, am häufigsten *Candida albicans* isoliert. Die Prävalenz von *Candida albicans* bei Psoriasispatienten lag dabei zwischen 20 und 60 %. In den Kontrollgruppen schwankte sie zwischen 2,8 und 22 % (134-139).

Verglichen mit der hier vorliegenden Studie beziehen sich die Untersuchungen anderer Gruppen auf deutlich geringe Probandenzahlen. Je nach Studie lag die Zahl der untersuchten Personen bei 50 bis 100 pro Gruppe. Im Gegensatz dazu wurden in unserer Studie 265 Psoriasispatienten sowie 200 Kontrollprobanden eingeschlossen.

Bei Betrachtung der Prävalenz von Hefepilzen an unterschiedlichen Lokalisationen ließ sich bei Psoriasispatienten im Vergleich zu Kontrollprobanden eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* von Mundhöhle und Darm nachweisen. Auf gesunder Haut hingegen bestanden keine Unterschiede, wobei in diesem Fall nur bei sehr wenigen Studienteilnehmern tatsächlich Hefen nachgewiesen werden konnten. Insgesamt waren in der Psoriasisgruppe nur 1,5 % und in der Kontrollgruppe 1 % der Studienteilnehmer besiedelt. Hefen der Gattung *Candida* konnten aus 1,6 % der Plaqueabstriche isoliert werden. Die niedrige Prävalenz von *Candida* auf Psoriasisplaque lässt sich durch das dort vorherrschende IL-17 dominierte Entzündungsmilieu, welches eine Besiedlung von Hefepilzen weitestgehend verhindert, erklären (151). Andere Studien fanden auf gesunder Haut bei Psoriasispatienten eine *Candida* Prävalenz zwischen 0 und 15 %. In den entsprechenden Kontrollgruppen waren 0 bis 4 % mit *Candida species* besiedelt (135, 137). Taheri Sarvtin et al. beobachteten eine signifikant stärkere Besiedelung mit *Candida species* am Rumpf von Psoriasispatienten, jedoch konnten sie aus Abstrichen der Kopfhaut, der Extremitäten und aus Beugestellen in keiner Gruppe *Candida species* isolieren (137). Insgesamt zeigten somit alle Untersuchungen eine geringe Prävalenz von Hefepilzen auf gesunder Haut. Falls *Candida species* Einfluss auf die Entzündungsreaktion bei Psoriasis haben, so sind auf Grund der deutlich häufigeren Prävalenz eher Besiedlungen in Mund und Darmbereich dafür verantwortlich.

So konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit bei fast jedem zweiten Psoriasispatienten (47,2 %) *Candida species* und bei jedem Dritten (33,2 %) *Candida albicans* in Mundschleimhautabstrichen nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe waren die Prävalenzen von *Candida species* (20 %) und *Candida albicans* (15 %) im Mundraum weniger als halb so hoch. Dabei konnte festgestellt werden, dass Probanden mit Psoriasis in der Mundhöhle nicht nur signifikant häufiger mit *Candida species* allgemein, sondern auch signifikant häufiger mit der klinisch relevantesten Art *Candida albicans* besiedelt sind (151). Vorherige Studien wiesen mit Ausnahme von einer Studie ebenfalls eine signifikant häufigere Besiedelung der Mundhöhle mit *Candida species* bei Psoriasispatienten nach (134-139). Leibovici et al. fanden zwar auch eine häufigere Besiedelung von Psoriasispatienten, jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (135). Insgesamt lagen in diesen Studien die Prävalenzen von *Candida species* zwischen 20 und 78 % bei Psoriasispatienten sowie zwischen 2,8 und 50 % in den



entsprechenden Kontrollgruppen. Sofern bestimmt, betrug die Prävalenz von *Candida albicans* 20 bis 60 % bei Psoriasispatienten und 2,8 bis 22 % bei Kontrollprobanden (134-139).

Mögliche Unterschiede hinsichtlich der *Candida* Prävalenz im Darm wurden bisher nur in einer Studie untersucht. Waldman et al. wiesen 2001 eine signifikant häufigere Besiedelung von Psoriasispatienten nach, wobei sie jedoch nur 50 Personen pro Gruppe untersuchten. Insgesamt fanden sie *Candida species* bei 72 % der Psoriasispatienten sowie bei 46 % der Kontrollprobanden (134). Zwei ältere Studien untersuchten die generelle Besiedelung mit Hefepilzen unabhängig der Gattung, wobei sie ebenfalls eine signifikant häufigere Besiedelung bei Personen mit Psoriasis fanden (167, 168). Darüber hinaus konnte eine vierte Studie bei 52 % der untersuchten Psoriasispatienten im Stuhl *Candida species* nachweisen. Jedoch schlossen sie dabei ausschließlich Patienten ohne immunsuppressive Therapie ein und verzichteten auf eine Kontrollgruppe (169). In allen vier Studien war *Candida albicans* der am häufigsten isolierte Pilz (134, 167-169). Im Rahmen dieser Promotion wurden Stuhlproben von 179 Patienten mit Psoriasis sowie 113 Kontrollprobanden untersucht. Dabei konnte ebenfalls eine signifikant häufigere Besiedelung von *Candida species* bei Probanden mit Psoriasis nachgewiesen werden. Die Prävalenz von *Candida species* im Stuhl betrug dabei in der Psoriasisgruppe 57 %. In der Kontrollgruppe lag sie bei 42,5 %. Ebenso wie in vorherigen Untersuchungen war *Candida albicans* in beiden Gruppen der am häufigsten isolierte Pilz. Jedoch zeigten sich zwischen Psoriasispatienten und Kontrollprobanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz von *Candida albicans*. Interessanterweise konnte in der Kontrollgruppe jedoch eine häufigere Besiedelung mit dem Milchsammel *Geotrichum candidum* nachgewiesen werden (151). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Buslau et al., die 1990 eine häufigere Besiedelung bei Psoriasispatienten fanden (168). *Geotrichum candidum* ist physiologischer Bestandteil der menschlichen Darmflora und wird darüber hinaus zur Veredelung von Käseprodukten verwendet. Infektionen sind, mit weniger als 100 gemeldeten Fällen zwischen 1842 und 2006, äußerst selten (170). Möglicherweise ist die hier gefundene häufigere Besiedelung der Kontrollgruppe ein weiterer Beleg einer substanziiell veränderten Darmflora bei Psoriasispatienten. Jedoch sind im Hinblick auf die gegensätzlichen Ergebnisse von Buslau et al. weitere Studien zur Klärung nötig.

Neben der Prävalenz wurde zusätzlich die Stärke des Pilzwachstums untersucht, was Rückschlüsse über das Ausmaß der Besiedelung erlaubte. Dabei fand sich ein signifikant stärkeres Pilzwachstum in Mundschleimhautabstrichen von Patienten mit Psoriasis. Die untersuchten Psoriasispatienten waren somit zumindest in der Mundhöhle nicht nur häufiger, sondern auch stärker mit *Candida albicans* und anderen *Candida species* besiedelt. Diese Beobachtung deckt sich dabei mit den Ergebnissen von Bedair et al., die im Speichel von Psoriasispatienten ebenfalls ein stärkeres Pilzwachstum nachweisen konnten (136). In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stuhlproben konnten hingegen keine relevanten Unterschiede im Wachstumsverhalten festgestellt werden. Dies lässt sich vermutlich durch ein auffallend kräftiges Pilzwachstum in beiden Gruppen erklären. Methodisch wurde zwischen keinem Wachstum,  $\leq 2$  Kolonien,  $> 2$  und  $\leq 5$  Kolonien, mehreren ( $\leq 15$ ) Kolonien und reichlich Wachstum ( $> 15$  Kolonien) unterschieden. Möglicherweise war diese Unterteilung zu grob, um signifikante Unterschiede, bei in beiden Gruppen kräftigen Wachstum, abzubilden. Auf Analysen des Wachstumsverhalten aus Achselabstrichen wurde auf Grund einer sehr geringen Prävalenz verzichtet.

#### 4.2 Mögliche Einflussfaktoren auf eine Besiedelung mit *Candida species*

Die Ursachen für die erhöhte Prävalenz von *Candida species* und das zum Teil auch stärkere Pilzwachstum bei Psoriasispatienten sind aktuell noch unklar. Taheri Sarvtin et al. beobachteten bei Psoriasispatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger gegen *Candida albicans* gerichtete Immunglobuline. Aus dieser reduzierten Anzahl an Antikörpern leiteten sie ein erhöhtes Risiko für eine Besiedelung mit Hefepilzen ab. Jedoch fanden sie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge an spezifischen Immunglobulinen und einer Besiedelung (137). Ebenso beobachteten Liang et al. in einer kleineren Studie bei Psoriasispatienten neben erniedrigten IgA- und IgM-Spiegeln auch erhöhte IgG-Level gegen *Candida albicans* (171).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden zur weiteren Klärung nun zunächst der Einfluss von Alter, Geschlecht und Therapie auf eine Besiedelung mit Hefepilzen

untersucht. Darüberhinaus wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und der Besiedelung mit *Candida species* besteht. Einschränkend muss hierbei jedoch erwähnt werden, dass es weitere mögliche und hier nicht untersuchte Einflussfaktoren gibt, die auch in weiterführenden Studien bedacht und gegebenenfalls untersucht werden sollten. Dazu zählen eine schlechte Zahnhygiene, Nikotinabusus und eine zuckerreiche Ernährung. So wurde bei gesunden Probanden, die größere Mengen zuckerhaltiger Getränke konsumierten, eine erhöhte Prävalenz von *Candida species* beobachtet (172). Größere Mengen an Zucker befinden sich jedoch nicht nur in Getränken und Süßigkeiten, sondern auch in Obst und einem Großteil der verarbeiteten Lebensmittel, weshalb die Menge des konsumierten Zuckers und somit dessen Einfluss nur schwer erfassbar ist. Im Falle des Rauchens beobachteten einige Autoren eine vermehrte Besiedelung mit Hefepilzen bei Rauchern (173-177). In anderen Studien wurde zwischen Rauchern und Nichtrauchern hingegen kein Unterschied in der Prävalenz von Hefepilzen beobachtet (136, 178-182). Ebenso wurde kein Unterschied zwischen rauchenden und nichtrauchenden Psoriasispatienten gefunden (136). Darüber hinaus besteht bei der Erhebung des Rauchverhaltens die Gefahr von Verzerrungen durch sozial erwünschtes Antwortverhalten, weshalb wir uns in dieser Studie auf die besser objektivierbaren Einflussfaktoren Alter, Geschlecht, Therapie und Krankheitsausprägung beschränkt haben.

Bisherige Untersuchungen konnten bei Psoriasispatienten keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und einer Besiedelung mit Hefepilzen feststellen (135, 136, 139). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Promotionsarbeit sowohl bei älteren Psoriasispatienten als auch bei älteren Kontrollprobanden eine signifikant häufigere Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* nachgewiesen werden. Ältere Studienteilnehmer hatten in beiden Gruppen ein in etwa 2-mal größeres Risiko einer Besiedelung mit *Candida species* und *Candida albicans* (151). Ursache der häufigeren Besiedelung von älteren Studienteilnehmern ist möglicherweise die abnehmende Leistung des Immunsystems bei älteren Menschen. Im Gegensatz dazu konnte, ebenso wie in vorherigen Studien, kein geschlechtsabhängiger Unterschied festgestellt werden (135, 136, 139). Das Geschlecht hat somit keinen Einfluss auf die Prävalenz einer Besiedelung mit *Candida species* (151).

Der Einfluss der Therapie ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Zwar geht eine immunsuppressive Behandlung mit einem erhöhten Risiko für Infektionskrankheiten einher, der Einfluss auf die auf die Prävalenz von Hefepilzen ist jedoch nicht eindeutig geklärt. So konnten Bedair et al. keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Psoriasispatienten feststellen, wobei der größte Teil ihrer Probanden rein topisch therapiert wurde und insgesamt nur 8 % systemisch wirksame Medikamente einnahmen (136). Ebenso fanden Lesan et al. keinen Unterschied zwischen unbehandelten und phototherapeutisch behandelten Patienten (139). Chularojanamontri et al. beobachteten bei 60 untersuchten Studienteilnehmern eine häufigere Besiedelung von systemisch behandelten Patienten (138). Im Gegensatz dazu fanden Picciani et al. in einer größeren Studie keinen Unterschied zwischen der Art der Behandlung und dem Auftreten oraler Candidosen (183). IL-17A ist ein zentraler Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr von *Candida species* und genetische Defekte im TH17/IL-17 Signalweg gehen mit einer erhöhten Anfälligkeit für lokale und invasive Candidosen einher (78, 79, 127-133). Ebenso sind Candidainfektionen eine zwar seltene, aber dennoch typische Nebenwirkung nach therapeutischer Ausschaltung von IL-17A (69, 70). So ergab eine systemische Untersuchung der Zulassungsstudien eine Inzidenz von Candidainfektionen in Höhe von 3,3 % bei Verwendung von Ixekizumab beziehungsweise von 1,7 % unter Therapie mit Secukinumab. Im Gegensatz dazu betrug die Inzidenz in den Placebogruppen 0,3 %, 0,8 % unter Behandlung mit dem TNF-Inhibitor Etanercept und 2,3 % unter Therapie mit dem IL-12p40/IL-23p40-Antikörper Ustekinumab (69). Eine Besiedelung mit *Candida* muss nicht zwingend auch zu einer Candidose führen, aber dennoch besteht bei Besiedelten zumindest in der Theorie ein erhöhtes Infektionsrisiko. Deshalb bestand eines der zentralen Ziele dieser Promotionsarbeit in der Klärung, ob eine systemische Psoriasis-therapie und insbesondere eine Behandlung mit IL-17A Inhibitoren eine Besiedelung mit *Candida species* begünstigt. Unsere monozentrischen Daten zeigen, dass Systemtherapeutika im Allgemeinen und ebenso eine Behandlung mit IL-17A Inhibitoren nicht zu einer vermehrten Besiedelung mit *Candida* bei Psoriasispatienten führen. Dennoch sollten aber insbesondere ältere Psoriasispatienten (>51 a) unter Behandlung mit IL-17A Inhibitoren regelmäßig auf Symptome einer Candidainfektion untersucht werden (151).

Ein weiteres Ziel dieser Studie bestand in der Überprüfung, ob ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Psoriasis und einer Besiedelung mit *Candida species* besteht. Die hierzu entsprechende Studienlage ist uneindeutig. So wurde in den Achtzigerjahren unter antimykotischer Therapie mit Nystatin beziehungsweise Ketoconazol bei einem Teil der untersuchten Patienten eine Symptomverbesserung beobachtet (147-150). Ebenso fanden Lesan et al. in einer neueren Studie eine häufigere Besiedelung von schwerer betroffenen Psoriasispatienten (139). Picciani et al. beobachteten ein vermehrtes Auftreten oraler Candidosen bei Patienten mit einem PASI von  $> 12$  (183). Ovčina-Kurtović et al. fanden eine vermehrte Besiedelung der Haut von Patienten mit einem PASI von  $> 50$ , wobei sie jedoch im Stuhl derselben Probanden keinen Unterschied nachweisen konnten (169). Drei weitere Studien konnten überhaupt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Schwere der Psoriasis und der Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* zeigen (134-136). Zur weiteren Klärung wurde in unserer Studie nun untersucht, ob Psoriasispatienten mit mittelschwerer bis schwerer Krankheitsausprägung (PASI  $> 10$ ) häufiger mit *Candida species* besiedelt sind. Dabei ließ sich keine häufigere Besiedelung von schwerer mit Psoriasis betroffenen Patienten feststellen. Ebenso ergab sich kein Hinweis auf eine geringere Besiedelung von Psoriasispatienten mit zum Untersuchungszeitpunkt vollständig unauffälliger Haut (PASI = 0). Die Häufigkeit einer Besiedelung mit *Candida species* hatte somit keinen Einfluss auf die mittels PASI erfasste Schwere der Erkrankung. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass nur eine verhältnismäßig kleine Zahl an Patienten mit einem PASI von 0 (15 Probanden) beziehungsweise von  $> 10$  (8 Probanden) eingeschlossen wurde. Ebenso verringert eine adäquate Therapie die Höhe des PASI, weshalb auch dieser Einfluss berücksichtigt werden muss (151). Ideal zur weiteren Abklärung wäre deshalb eine Untersuchung mit großer Probandenzahl und ausschließlich unbehandelten Patienten.

### 4.3 Unterschiede in der Immunogenität verschiedener *Candida albicans* Stämme und Vergleich der Immunantwort von mit *Candida species* besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, ob sich mit *Candida species* besiedelte und nicht besiedelte Psoriasispatienten in ihrer Immunreaktion unterscheiden. Dazu wurden PBMCs von 20 besiedelten und 24 nicht besiedelten Patienten mit LPS beziehungsweise den verschiedenen Stämmen von *Candida albicans* I-IL-17, I-LT und SC5314 stimuliert. Im Gegensatz zu vielen anderen *In-vitro*-Experimenten wurden lebendige Hefezellen zur Stimulation verwendet. Anders als inaktivierte Pilze interagieren lebendige Hefen aktiv mit Zellen des Immunsystems und können sich unter Umständen der Immunantwort entziehen. Darüber hinaus kommt es zu keinen inaktivierungsbedingten Veränderungen der Zellwand. So führt eine halbstündige Hitzeinaktivierung bei 56° C zu einem Anstieg von freien  $\beta$ -Glucanen auf der äußeren Zellwand. Diese freien  $\beta$ -Glucane werden in der Folge von dendritischen Zellen und Makrophagen über Dectin-1 erkannt (113, 114, 184). Die Erkennung von lebendigen *Candida albicans* Zellen erfolgt hingegen primär über TLR4 und Mannose-Rezeptoren.  $\beta$ -Glucane werden bei lebendigen Hefen von Mannanen und Mannoproteinen bedeckt. In demaskierter Form liegen sie nur während der Sprossung oder nach Beschädigung der Zellwand vor (113, 114, 185-187). Lebendige Hefen sind somit viel besser geeignet, um experimentell die komplexe biologische Interaktion zwischen dem Immunsystem und *Candida albicans* nachzubilden und sollten deshalb vorrangig verwendet werden. Neben drei verschiedenen *Candida albicans* Stämmen wurden die PBMCs mit LPS, einem stark immunogenen bakteriellen Endotoxin, inkubiert. Genauso wie lebendige Hefezellen stimuliert LPS Immunzellen über TLR4. Nach der Inkubation wurde die Genexpression der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$  bestimmt. Hierbei handelt es sich um die primär von T-Zellen produzierten Effektorzytokine, die zentrale Botenstoffe in der physiologischen Immunabwehr von *Candida species* und gleichzeitig der pathologischen Immunreaktion bei Psoriasis sind (13, 26, 34, 36, 78, 79, 117, 188-190).

Sollte eine Besiedelung mit *Candida* Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Psoriasispatienten haben, so sollte sich dies in einer veränderten Immunantwort nach Kontakt zu *Candida species* zeigen. Jedoch zeigten sich bei Vergleich der Immunreaktion

von besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten nach Stimulation mit *Candida albicans*, unabhängig vom verwendeten Stamm, und ebenso nach Stimulation mit LPS keine biologisch relevanten Unterschiede in der Zytokinexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$ . Dies zeigt, dass eine Besiedelung mit *Candida* keinen Einfluss auf die Immunantwort gegen *Candida albicans* hat und auch nicht die Produktion elementarer Effektorzytokine bei Psoriasis beeinflusst. Im Umkehrschluss ergeben sich aus den Daten dieser Arbeit keine Hinweise auf einen immunologischen Einfluss durch eine Besiedelung mit *Candida species* auf die Aktivität einer Psoriasis. Hierzu passen auch unsere klinischen Ergebnisse, die - wie oben dargestellt - keinen Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit (gemessen in Höhe des PASI) und einer Besiedelung mit *Candida species* nachweisen konnten (151).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die drei verschiedenen zur Stimulation verwendeten Stämme von *Candida albicans* eine unterschiedliche Immunreaktion hervorrufen. Wobei uns insbesondere interessierte, ob sich die Virulenz des unter Therapie mit einem IL-17 Antagonisten isolierten Stammes I-IL-17 durch ebendiese Therapie verändert und somit eine veränderte Immunreaktion hervorruft. Tatsächlich zeigte sich nach Stimulation mit diesem Stamm im Vergleich zu einer Stimulation mit dem Laborstamm SC5314 eine signifikant geringere IL-17 Antwort. Im Vergleich zu einer Stimulation mit dem unter rein lokaler Therapie isolierten Stamm I-LT fand sich bei I-IL-17 eine signifikant stärkere TNF- $\alpha$  Induktion. Dieser Befund gibt erste Hinweise auf einen möglicherweise bestehenden Einfluss einer systemischen Immunsuppression auf die Virulenz von Hefepilzen. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass der gängige Laborstamm SC5314 im Tiermodell eine nachgewiesenermaßen ausgeprägte Virulenz besitzt, was die hier gezeigte stärkere IL-17 Antwort erklären könnte (156). Hierzu passt, dass sich nach Stimulation mit SC5314 im Vergleich zu einer Stimulation mit I-LT ebenfalls eine signifikant stärkere IL-17 und auch IL-22 Antwort zeigte. Ebenso ist *Candida albicans* bekanntermaßen ein genetisch und phänotypisch sehr heterogener Pilz. Diese Vielfalt wiederum führt zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Pathogenität und in der Folge auch zu einer individuellen Immunantwort durch den menschlichen Organismus (97, 99, 152-155). Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen muss bedacht werden, dass die veränderte Immunantwort auf nur einen exemplarisch ausgewählten Stamm keine verallgemeinerbaren Rückschlüsse erlaubt. Hierzu werden weitere

Untersuchungen mit entsprechend adäquater Stichprobengröße sowie ein Vergleich der Virulenz der jeweiligen Stämme vor und nach Beginn der Immunsuppression benötigt.



## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchte ich, ob Psoriasispatienten häufiger als Nicht-Psoriatischer mit Hefen der Gattung *Candida* besiedelt sind. Die Prävalenz von Hefepilzen wurde bei 265 Psoriasispatienten und 200 Kontrollpersonen bestimmt. Als Untersuchungsmaterial dienten Stuhlproben und Abstriche von gesunder Haut, der Mundschleimhaut (MSH) sowie von Psoriasisplaques. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine deutlich häufigere Besiedelung von Psoriasispatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede in der Prävalenz von *Candida species* fanden sich in MSH Abstrichen sowie in Stuhlproben, jedoch nicht in Hautabstrichen. Darüber hinaus waren Psoriasispatienten enoral nicht nur häufiger mit *Candida* besiedelt, sondern es konnte bei Nachweis einer Besiedelung auch ein stärkeres Wachstum der jeweiligen Pilze nachgewiesen werden. Auf untersuchten Psoriasisplaques konnten nur vereinzelt Hefen nachgewiesen werden. Die niedrige Prävalenz von *Candida* auf Psoriasisplaques lässt sich durch das vorherrschende Th17 Entzündungsmilieu und der damit verbundenen Produktion von Abwehrstoffen in der verbreiterten Epidermis erklären. Diese wirken einer Etablierung von Hefepilzen entgegen. Unabhängig von Untersuchungsgruppe und Probenmaterial war *Candida albicans* der am häufigsten isolierte Pilz. Psoriasispatienten zeigten an der MSH signifikant häufiger eine *Candida albicans* Besiedelung als Kontrollen. Studienteilnehmer mit Psoriasis waren darüber hinaus mit mehr unterschiedlichen Arten der Gattung *Candida* besiedelt. So konnten bei Psoriasispatienten 13 und in der Kontrollgruppe 5 verschiedene Arten isoliert werden. Interessanterweise waren die Kontrollpersonen jedoch signifikant häufiger mit dem nahezu apathogenen Milchscheimpilz *Geotrichum candidum* besiedelt, was möglicherweise ein Zeichen für eine veränderte Darmflora von Patienten mit Psoriasis ist. In beiden Gruppen waren ältere Studienteilnehmer signifikant häufiger mit *Candida species* besiedelt. Das Geschlecht der Probanden hatte hingegen keinen Einfluss, aber auch die Art der medikamentösen Therapien hatten keinen Einfluss auf die Häufigkeit einer Besiedelung. Die Einnahme von systemisch wirkenden Medikamenten, insbesondere die von IL-17A Inhibitoren führte zu keiner gehäuften Besiedelung mit *Candida species* in unserer monozentrischen Erhebung. Candidosen sind eine seltene, aber dennoch typische Nebenwirkung unter Therapie mit IL-17A Inhibitoren. Zwar führt eine Besiedelung nicht unbedingt auch zu einer Candidose, aber das Risiko für eine

symptomatische Erkrankung ist gegeben. Ältere Psoriasispatienten unter Behandlung mit IL-17A Inhibitoren sollten regelmäßig auf Candidainfektionen untersucht werden.

Wir untersuchten ferner, ob eine Besiedelung mit *Candida* Einfluss auf die Immunantwort von Psoriasispatienten hat. Hieraus könnten sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Besiedelung mit *Candida* und der Krankheitsaktivität der Psoriasis ableiten lassen. PBMCs von 20 mit *Candida species* besiedelten und 24 nicht besiedelten Psoriasispatienten wurden isoliert und mit drei verschiedenen *Candida albicans* Stämmen sowie LPS stimuliert. Für die Stimulation mit *Candida* Stämmen wählten wir den Laborstamm SC5314 sowie zwei im Rahmen dieser Arbeit bei Psoriasispatienten isolierte Wildstämme I-IL-17 (von einem Patienten unter anti-IL-17 Therapie) und I-LT (von einem Patienten unter Lokalthherapie). Nach Stimulation wurde die Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 und TNF- $\alpha$  mittels quantitativer PCR gemessen. Die ausgewählten Zytokine sind integrale Bestandteile der physiologischen Immunreaktion auf *Candida*, gleichzeitig auch zentrale Botenstoffe in der Pathogenese der Psoriasis. Zwischen besiedelten und nicht besiedelten Psoriasispatienten zeigten sich keine biologisch relevanten Unterschiede in der Expression dieser Zytokine. Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine veränderte Immunreaktion bei mit *Candida* besiedelten Psoriasispatienten im Vergleich zu nicht besiedelten Patienten. Hierzu passt, dass sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Schwere der Psoriasis gemessen in Höhe des PASI und einer Besiedelung mit *Candida* nachweisen ließ.

Auch untersuchten wir, ob die drei verschiedenen zur Stimulation verwendeten *Candida albicans* Stämme eine unterschiedliche Immunreaktion hervorrufen und sich somit Rückschlüsse auf ihre Virulenz ergeben. Hierbei zeigte sich nach Stimulation mit dem I-IL-17 Stamm im Vergleich zu einer Stimulation mit SC5314 eine geringere Genexpression von IL-17. Die Stimulation mit I-IL-17 führte im Vergleich zu einer Stimulation mit I-LT zu einer verstärkten TNF- $\alpha$  Expression. Somit ergeben sich erste Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Virulenz von Hefepilzen durch eine systemische Immunsuppression. Limitierend ist die Querschnittsuntersuchung von drei *Candida* Stämmen. Der Laborstamm SC5314 ist zudem hochpathogen und führte im Vergleich zu einer Stimulation mit I-LT zu einer stärkeren IL-17 und IL-22 Expression. Weitere umfangreichere und longitudinale Untersuchungen zur genaueren Klärung der Interaktion von *Candida species* und Psoriasis Immuntherapien sind wünschenswert.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schafer I, Rustenbach SJ, Radtke M, Augustin J, Glaeske G, Augustin M. [Epidemiology of psoriasis in Germany--analysis of secondary health insurance data]. *Gesundheitswesen*. 2011;73(5):308-13.
2. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. *The Lancet*. 2015;386(9997):983-94.
3. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 1985;13(3):450-6.
4. Singh RK, Lee KM, Ucmak D, Brodsky M, Atanelov Z, Farahnik B, et al. Erythrodermic psoriasis: pathophysiology and current treatment perspectives. *Psoriasis (Auckl)*. 2016;6:93-104.
5. Henes JC, Ziupa E, Eisfelder M, Adamczyk A, Knaudt B, Jacobs F, et al. High prevalence of psoriatic arthritis in dermatological patients with psoriasis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2014;34(2):227-34.
6. Reich K. Approach to managing patients with nail psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23 Suppl 1:15-21.
7. Tan ES, Chong WS, Tey HL. Nail psoriasis: a review. *Am J Clin Dermatol*. 2012;13(6):375-88.
8. Kimball AB, Jacobson C, Weiss S, Vreeland MG, Wu Y. The psychosocial burden of psoriasis. *Am J Clin Dermatol*. 2005;6(6):383-92.
9. Schmid-Ott G, Malewski P, Kreiselmaier I, Mrowietz U. [Psychosocial consequences of psoriasis--an empirical study of disease burden in 3753 affected people]. *Hautarzt*. 2005;56(5):466-72.
10. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Jr., Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41(3 Pt 1):401-7.
11. Augustin M, Reich K, Glaeske G, Schaefer I, Radtke M. Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(2):147-51.
12. Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, Kurd SK, Shin DB, Wang X, et al. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol*. 2007;143(12):1493-9.
13. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(5):496-509.
14. Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaelsson G, Evans J, et al. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*. 2003;120(4):627-32.

15. Allen MH, Ameen H, Veal C, Evans J, Ramrakha-Jones VS, Marsland AM, et al. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2005;124(1):103-6.
16. Wu W, Debbaneh M, Moslehi H, Koo J, Liao W. Tonsillectomy as a treatment for psoriasis: a review. *J Dermatolog Treat.* 2014;25(6):482-6.
17. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol.* 2010;49(12):1351-61.
18. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol.* 2007;25(6):606-15.
19. Ghoreschi K, Rocken M. [Immunopathogenesis of psoriasis]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2003;1(7):524-32.
20. Lynde CW, Poulin Y, Vender R, Bourcier M, Khalil S. Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(1):141-50.
21. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 1994;94(1):202-9.
22. Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(4):401-7.
23. Buchau AS, Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol.* 2007;25(6):616-24.
24. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.* 2009;206(9):1983-94.
25. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-9.
26. Schakel K, Schon MP, Ghoreschi K. [Pathogenesis of psoriasis]. *Hautarzt.* 2016;67(6):422-31.
27. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med.* 2004;199(1):125-30.
28. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med.* 2005;202(1):135-43.

29. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-71.
30. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10(3):314-24.
31. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(4):345-50.
32. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-40.
33. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiochia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2013;38(2):336-48.
34. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martinez EJ, Duran-Avelar Mde J, Garcia-Magallanes N, Vibanco-Perez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflam*. 2014;2014:651503.
35. Shen F, Hu Z, Goswami J, Gaffen SL. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24138-48.
36. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol*. 2008;159(5):1092-102.
37. Harper EG, Guo C, Rizzo H, Lillis JV, Kurtz SE, Skorcheva I, et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(9):2175-83.
38. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):677-87.
39. Keijsers RR, Joosten I, van Erp PE, Koenen HJ, van de Kerkhof PC. Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol*. 2014;23(11):799-803.
40. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol*. 2008;180(11):7423-30.

41. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, et al. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med.* 2003;9(1):40-6.
42. Rosenberger C, Solovan C, Rosenberger AD, Jinping L, Treudler R, Frei U, et al. Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 2007;127(10):2445-52.
43. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica.* 1978;157(4):238-44.
44. Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, et al. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(1):1-10.
45. Finlay AY. Current severe psoriasis and the rule of tens. *Br J Dermatol.* 2005;152(5):861-7.
46. Fisher LB, Maibach HI. The effect of anthralin and its derivatives on epidermal cell kinetics. *J Invest Dermatol.* 1975;64(5):338-41.
47. Anderson R, Lukey PT, Dippenaar U, Eftychis HA, Findlay GH, Wooten MW, et al. Dithranol mediates pro-oxidative inhibition of polymorphonuclear leukocyte migration and lymphocyte proliferation. *Br J Dermatol.* 1987;117(4):405-18.
48. Sterry W, Czaika VA, Drecoll U, Hadshiew I, Kiecker F, Papakostas D, et al. *Kurzlehrbuch Dermatologie. 2., aktualisierte Auflage ed.* Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2018. XII, 351 Seiten p.
49. Nast A, Amelunxen L, Augustin M, Boehncke WH, Dressler C, Gaskins M, et al. S3 Guideline for the treatment of psoriasis vulgaris, update - Short version part 1 - Systemic treatment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2018;16(5):645-69.
50. Bruck J, Dringen R, Amasuno A, Pau-Charles I, Ghoreschi K. A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2018.
51. Lehmann JC, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igney FH, von Bonin A, Hennekes HH, et al. Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):835-45.
52. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med.* 2011;208(11):2291-303.
53. Sebok B, Bonnekoh B, Geisel J, Mahrle G. Antiproliferative and cytotoxic profiles of antipsoriatic fumaric acid derivatives in keratinocyte cultures. *Eur J Pharmacol.* 1994;270(1):79-87.

54. Ryu J, Kwon MJ, Nam TJ. Nrf2 and NF-kappaB Signaling Pathways Contribute to Porphyrin-334-Mediated Inhibition of UVA-Induced Inflammation in Skin Fibroblasts. *Mar Drugs*. 2015;13(8):4721-32.
55. Helwa I, Patel R, Karempelis P, Kaddour-Djebbar I, Choudhary V, Bollag WB. The antipsoriatic agent monomethylfumarate has antiproliferative, prodifferentiative, and anti-inflammatory effects on keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;352(1):90-7.
56. Wolfe F, Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis Rheum*. 2004;50(6):1740-51.
57. Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(7):1100-4.
58. Herfarth HH, Long MD, Isaacs KL. Methotrexate: underused and ignored? *Dig Dis*. 2012;30 Suppl 3:112-8.
59. Schafer PH, Parton A, Capone L, Cedzik D, Brady H, Evans JF, et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal*. 2014;26(9):2016-29.
60. Schafer PH, Chen P, Fang L, Wang A, Chopra R. The pharmacodynamic impact of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, on circulating levels of inflammatory biomarkers in patients with psoriatic arthritis: substudy results from a phase III, randomized, placebo-controlled trial (PALACE 1). *J Immunol Res*. 2015;2015:906349.
61. Deeks ED. Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs*. 2015;75(12):1393-403.
62. Gottlieb AB, Matheson RT, Menter A, Leonardi CL, Day RM, Hu C, et al. Efficacy, tolerability, and pharmacodynamics of apremilast in recalcitrant plaque psoriasis: a phase II open-label study. *J Drugs Dermatol*. 2013;12(8):888-97.
63. Gottlieb AB, Strober B, Krueger JG, Rohane P, Zeldis JB, Hu CC, et al. An open-label, single-arm pilot study in patients with severe plaque-type psoriasis treated with an oral anti-inflammatory agent, apremilast. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(5):1529-38.
64. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(4):643-59.
65. Ortiz NE, Nijhawan RI, Weinberg JM. Acitretin. *Dermatol Ther*. 2013;26(5):390-9.

66. Lebwohl M. Acitretin in combination with UVB or PUVA. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(3 Pt 2):S22-4.
67. Filler SG, Yeaman MR, Sheppard DC. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 3:S208-12.
68. Tsiodras S, Samonis G, Boumpas DT, Kontoyiannis DP. Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(2):181-94.
69. Saunte DM, Mrowietz U, Puig L, Zachariae C. Candida infections in patients with psoriasis and psoriatic arthritis treated with interleukin-17 inhibitors and their practical management. *Br J Dermatol.* 2017;177(1):47-62.
70. Deodhar A, Mease PJ, McInnes IB, Baraliakos X, Reich K, Blauvelt A, et al. Long-term safety of secukinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: integrated pooled clinical trial and post-marketing surveillance data. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):111.
71. Ritchlin C, Rahman P, Kavanaugh A, McInnes IB, Puig L, Li S, et al. Efficacy and safety of the anti-IL-12/23 p40 monoclonal antibody, ustekinumab, in patients with active psoriatic arthritis despite conventional non-biological and biological anti-tumour necrosis factor therapy: 6-month and 1-year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised PSUMMIT 2 trial. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(6):990-9.
72. Armstrong AW, Bukhalo M, Blauvelt A. A Clinician's Guide to the Diagnosis and Treatment of Candidiasis in Patients with Psoriasis. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17(4):329-36.
73. Luo J, Wu SJ, Lacy ER, Orlovsky Y, Baker A, Teplyakov A, et al. Structural basis for the dual recognition of IL-12 and IL-23 by ustekinumab. *J Mol Biol.* 2010;402(5):797-812.
74. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-9.
75. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med.* 2014;371(4):326-38.
76. Lebwohl M, Strober B, Menter A, Gordon K, Weglowska J, Puig L, et al. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. *N Engl J Med.* 2015;373(14):1318-28.
77. Griffiths CE, Reich K, Lebwohl M, van de Kerkhof P, Paul C, Menter A, et al. Comparison of ixekizumab with etanercept or placebo in moderate-to-severe psoriasis (UNCOVER-2 and UNCOVER-3): results from two phase 3 randomised trials. *Lancet.* 2015;386(9993):541-51.



78. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis.* 2004;190(3):624-31.
79. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med.* 2009;206(2):299-311.
80. Schon MP, Zollner TM, Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 2003;121(5):951-62.
81. Lowes MA, Suarez-Farinas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-55.
82. McDonagh AF. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. *J Perinatol.* 2001;21 Suppl 1:S7-S12.
83. Wong T, Hsu L, Liao W. Phototherapy in psoriasis: a review of mechanisms of action. *J Cutan Med Surg.* 2013;17(1):6-12.
84. Johnson-Huang LM, Suarez-Farinas M, Sullivan-Whalen M, Gilleaudeau P, Krueger JG, Lowes MA. Effective narrow-band UVB radiation therapy suppresses the IL-23/IL-17 axis in normalized psoriasis plaques. *J Invest Dermatol.* 2010;130(11):2654-63.
85. Walters IB, Ozawa M, Cardinale I, Gilleaudeau P, Trepicchio WL, Bliss J, et al. Narrowband (312-nm) UV-B suppresses interferon gamma and interleukin (IL) 12 and increases IL-4 transcripts: differential regulation of cytokines at the single-cell level. *Arch Dermatol.* 2003;139(2):155-61.
86. DeSilva B, McKenzie RC, Hunter JA, Norval M. Local effects of TL01 phototherapy in psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008;24(5):268-9.
87. Ozawa M, Ferenczi K, Kikuchi T, Cardinale I, Austin LM, Coven TR, et al. 312-nanometer ultraviolet B light (narrow-band UVB) induces apoptosis of T cells within psoriatic lesions. *J Exp Med.* 1999;189(4):711-8.
88. Aly R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31(3 Pt 2):S21-5.
89. Hof H, Dörries Rd. *Medizinische Mikrobiologie.* 4. vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Stuttgart: Thieme; 2009. XX, 731 S. p.
90. Bhatti Z, Shaikat A, Almyroudis NG, Segal BH. Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia.* 2006;162(1):1-15.
91. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):497-516.

92. Whibley N, Gaffen SL. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. *Cytokine*. 2015;76(1):42-52.
93. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011;10(2):112-22.
94. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog*. 2013;9(9):e1003550.
95. Hof H. *Mykologie für Mediziner Grundlagen, Pathogenese, Manifestationen, Diagnostik, Therapie*; 64 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2003. 43-65 p.
96. Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(6):1041-52.
97. Schonherr FA, Sparber F, Kirchner FR, Guiducci E, Trautwein-Weidner K, Gladiator A, et al. The intraspecies diversity of *C. albicans* triggers qualitatively and temporally distinct host responses that determine the balance between commensalism and pathogenicity. *Mucosal Immunol*. 2017;10(5):1335-50.
98. MacCallum DM, Castillo L, Nather K, Munro CA, Brown AJ, Gow NA, et al. Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryot Cell*. 2009;8(3):373-87.
99. Braunsdorf C, LeibundGut-Landmann S. Modulation of the Fungal-Host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens*. 2018;7(1).
100. Bottcher B, Pollath C, Staib P, Hube B, Brunke S. *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamyospore Formation. *Front Microbiol*. 2016;7:1697.
101. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317-24.
102. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(10):737-48.
103. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(2):96-108.
104. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.
105. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*. 2016;532(7597):64-8.

106. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*. 1999;283(5407):1535-8.
107. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001;147(Pt 8):1997-2005.
108. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*. 2007;5(3):e64.
109. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Front Immunol*. 2017;8:629.
110. Uwamahoro N, Verma-Gaur J, Shen HH, Qu Y, Lewis R, Lu J, et al. The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *MBio*. 2014;5(2):e00003-14.
111. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 2001;413(6851):36-7.
112. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, et al. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*. 2002;46(7):503-12.
113. Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1642-50.
114. Gow NA, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1565-71.
115. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
116. Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:21-7.
117. Kashem SW, Kaplan DH. Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends Immunol*. 2016;37(7):440-50.
118. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*. 1993;260(5107):547-9.
119. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(2):112-24.

120. Gozalbo D, Gil ML. IFN-gamma in *Candida albicans* infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:1970-8.
121. El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *J Neuroimmunol*. 2008;200(1-2):11-6.
122. Kashem SW, Riedl MS, Yao C, Honda CN, Vulchanova L, Kaplan DH. Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b+ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity. *Immunity*. 2015;43(3):515-26.
123. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-98.
124. Maher CO, Dunne K, Comerford R, O'Dea S, Loy A, Woo J, et al. *Candida albicans* stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by Vdelta1 T cells. *J Immunol*. 2015;194(12):5953-60.
125. Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB, Jr. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2596-601.
126. Netea MG, van Tits LJ, Curfs JH, Amiot F, Meis JF, van der Meer JW, et al. Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol*. 1999;163(3):1498-505.
127. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med*. 2010;207(2):299-308.
128. Puel A, Doffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med*. 2010;207(2):291-7.
129. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011;332(6025):65-8.
130. van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, Smeekens SP, Joosten LA, Gilissen C, et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med*. 2011;365(1):54-61.
131. Chandesris MO, Melki I, Natividad A, Puel A, Fieschi C, Yun L, et al. Autosomal dominant STAT3 deficiency and hyper-IgE syndrome: molecular, cellular, and clinical features from a French national survey. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(4):e1-19.

132. Boisson B, Wang C, Pedergnana V, Wu L, Cypowyj S, Rybojad M, et al. An ACT1 mutation selectively abolishes interleukin-17 responses in humans with chronic mucocutaneous candidiasis. *Immunity*. 2013;39(4):676-86.
133. Drewniak A, Gazendam RP, Tool AT, van Houdt M, Jansen MH, van Hamme JL, et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency. *Blood*. 2013;121(13):2385-92.
134. Waldman A, Gilhar A, Duek L, Berdicevsky I. Incidence of *Candida* in psoriasis--a study on the fungal flora of psoriatic patients. *Mycoses*. 2001;44(3-4):77-81.
135. Leibovici V, Alkalay R, Hershko K, Ingber A, Westerman M, Leviatan-Strauss N, et al. Prevalence of *Candida* on the tongue and intertriginous areas of psoriatic and atopic dermatitis patients. *Mycoses*. 2008;51(1):63-6.
136. Bedair AA, Darwazeh AM, Al-Aboosi MM. Oral *Candida* colonization and candidiasis in patients with psoriasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114(5):610-5.
137. Taheri Sarvtin M, Shokohi T, Hajheydari Z, Yazdani J, Hedayati MT. Evaluation of candidal colonization and specific humoral responses against *Candida albicans* in patients with psoriasis. *Int J Dermatol*. 2014;53(12):e555-60.
138. Chularojanamontri L, Wongpraparut C, Tuchinda P, Winayanuwattikun W, Boonyasiri A, Kulthanan K, et al. Oral *Candida* Colonization in Thai Patients with Psoriasis. *J Med Assoc Thai*. 2016;99(1):84-7.
139. Lesan S, Toosi R, Aliakbarzadeh R, Daneshpazhooh M, Mahmoudi L, Tavakolpour S, et al. Oral *Candida* colonization and plaque type psoriasis: Is there any relationship? *J Investig Clin Dent*. 2018:e12335.
140. Leung DY, Walsh P, Giorno R, Norris DA. A potential role for superantigens in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1993;100(3):225-8.
141. Leung DY, Travers JB, Giorno R, Norris DA, Skinner R, Aelion J, et al. Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2106-12.
142. Sayama K, Midorikawa K, Hanakawa Y, Sugai M, Hashimoto K. Superantigen production by *Staphylococcus aureus* in psoriasis. *Dermatology*. 1998;196(2):194-8.
143. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Clinical analysis of staphylococcal superantigen hyper-reactive patients with psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol*. 1998;8(5):325-9.
144. Devore-Carter D, Kar S, Vellucci V, Bhattacharjee V, Domanski P, Hostetter MK. Superantigen-like effects of a *Candida albicans* polypeptide. *J Infect Dis*. 2008;197(7):981-9.

145. Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2009;30(10):494-501.
146. Rosenberg EW, Noah PW, Skinner RB, Jr. Psoriasis is a visible manifestation of the skin's defense against micro-organisms. *J Dermatol.* 1994;21(6):375-81.
147. Farr PM, Krause LB, Marks JM, Shuster S. Response of scalp psoriasis to oral ketoconazole. *Lancet.* 1985;2(8461):921-2.
148. Rosenberg EW, Belew PW. Improvement of psoriasis of the scalp with ketoconazole. *Arch Dermatol.* 1982;118(6):370-1.
149. Kumar B, Kaur I, Talwar P, Kaur S. Nystatin in Psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 1989;55(3):170-2.
150. Buslau M, Hanel H, Holzmann H. [The significance of yeasts in seborrheic eczema]. *Hautarzt.* 1989;40(10):611-3.
151. Elsner K, Holstein J, Hilke FJ, Blumenstock G, Walker B, Schmidt S, et al. Prevalence of *Candida* species in Psoriasis. *Mycoses.* 2022;65(2):247-54.
152. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459(7247):657-62.
153. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* 2003;2(5):1053-60.
154. Hickman MA, Zeng G, Forche A, Hiraikawa MP, Abbey D, Harrison BD, et al. The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature.* 2013;494(7435):55-9.
155. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 1997;90(5):939-49.
156. Odds FC, Van Nuffel L, Gow NA. Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. *Microbiology.* 2000;146 ( Pt 8):1881-9.
157. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol.* 2004;5(7):230.
158. Schaller M, Zakikhany K, Naglik JR, Weindl G, Hube B. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2767-73.
159. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:7.

160. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.
161. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401.
162. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie, Genomics.* 7., aktualisierte Aufl. ed. Heidelberg Berlin: Springer Spektrum; 2013. 103-8 p.
163. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7276-80.
164. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4(6):357-62.
165. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
166. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
167. Senff H, Bothe C, Busacker J, Reinel D. Studies on the yeast flora in patients suffering from psoriasis capillitii or seborrhoic dermatitis of the scalp. *Mycoses.* 1990;33(1):29-32.
168. Buslau M, Menzel I, Holzmann H. Fungal flora of human faeces in psoriasis and atopic dermatitis. *Mycoses.* 1990;33(2):90-4.
169. Ovcina-Kurtovic N, Kasumagic-Halilovic E, Helppikangans H, Begic J. Prevalence of *Candida* Species in Patients with Psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2016;24(3):209-13.
170. Pottier I, Gente S, Vernoux JP, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *Int J Food Microbiol.* 2008;126(3):327-32.
171. Liang YS, Wen HQ, Xiao R. [Serum levels of antibodies for IgG, IgA, and IgM against the fungi antigen in psoriasis vulgaris]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003;28(6):638-40.
172. Lll KG, Klimczak A, Rachubinski P, Jaglowska A, Kwapiszewska A. Consumption of sweetened beverages as a risk factor of colonization of oral cavity by fungi - eating habits of university students. *Ann Parasitol.* 2015;61(3):175-82.
173. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res.* 2001;35(2):149-55.

174. Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS. The relationship between oral Candida carriage and the secretor status of blood group antigens in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(1):48-53.
175. Keten HS, Keten D, Ucer H, Yildirim F, Hakkoymaz H, Isik O. Prevalence of oral Candida carriage and Candida species among cigarette and maras powder users. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):9847-54.
176. Sheth CC, Makda K, Dilmahomed Z, Gonzalez R, Luzi A, Jovani-Sancho Mdel M, et al. Alcohol and tobacco consumption affect the oral carriage of *Candida albicans* and mutants streptococci. *Lett Appl Microbiol.* 2016;63(4):254-9.
177. Akram Z, Al-Kheraif AA, Kellesarian SV, Vohra F, Javed F. Comparison of oral Candida carriage in waterpipe smokers, cigarette smokers, and non-smokers. *J Oral Sci.* 2018;60(1):115-20.
178. Darwazeh AM, Al-Dwairi ZN, Al-Zwairi AA. The relationship between tobacco smoking and oral colonization with *Candida* species. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11(3):017-24.
179. Gergely L, Uri J. Day-by-day variation in the mycotic flora of the mouth. *Arch Oral Biol.* 1966;11(1):15-9.
180. Oliver DE, Shillitoe EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. *J Oral Pathol.* 1984;13(3):265-70.
181. Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil.* 2002;29(5):452-7.
182. Rasool S, Siar CH, Ng KP. Oral candidal species among smokers and non-smokers. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2005;15(11):679-82.
183. Picciani BL, Michalski-Santos B, Carneiro S, Sampaio AL, Avelleira JC, Azulay DR, et al. Oral candidiasis in patients with psoriasis: correlation of oral examination and cytopathological evaluation with psoriasis disease severity and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(6):986-91.
184. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 2003;19(3):311-5.
185. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 2005;24(6):1277-86.
186. Wheeler RT, Kombe D, Agarwala SD, Fink GR. Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog.* 2008;4(12):e1000227.



187. Wheeler RT, Fink GR. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog.* 2006;2(4):e35.
188. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8(6):639-46.
189. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(9):950-7.
190. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol.* 2009;182(9):5836-45.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt.

Die Konzipierung und Ausarbeitung des Studienkonzepts sowie die Leitung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Kamran Ghoreschi.

Die Betreuung dieser Arbeit erfolgte durch Frau Dr. Katharina Meier.

Die Untersuchung der Abstriche und Stuhlproben auf das Vorhandensein von *Candida species* erfolgte durch das Labor der Infektionsdermatologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Prof. Dr. Martin Schaller und Prof. Dr. Kamran Ghoreschi).

Sämtliche experimentellen Laboruntersuchungen wurden, nach zuvor erfolgter Einarbeitung durch Frau Julia Holstein, von mir eigenständig durchgeführt.

Darüber hinaus zählte zu meinen Aufgaben die Rekrutierung der Probanden, die Probengewinnung sowie die Erstellung sämtlicher Abbildungen und Graphiken.

Die statistische Auswertung und Analyse erfolgte nach Beratung durch Herrn Dr. Gunnar Blumenstock aus dem biometrischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig mit Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Kamran Ghoreschi und Frau Dr. Katharina Meier verfasst zu haben. Außer den von mir genannten, verwendete ich keine weiteren Quellen.

---

Doktorand Kevin Elsner

## 8 Veröffentlichungen

Auszüge der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Elsner K, Holstein J, Hilke FJ, Blumenstock G, Walker B, Schmidt S, et al. Prevalence of *Candida* species in Psoriasis. *Mycoses*. 2022;65(2):247-54.