

B. Hube · A. Albrecht · O. Bader · S. Beinhauer · A. Felk · C. Fradin · D. Kunze · M. Niewerth
Robert Koch-Institut, Berlin

Pathogenitätsfaktoren bei Pilzinfektionen

Arbeiten der Nachwuchsgruppe „Pathogenitätsfaktoren bei Pilzinfektionen“ des Robert Koch-Instituts

Für die starke Zunahme von Infektionen durch opportunistische Pilze sind vor allem prädisponierende Faktoren verantwortlich, welche die natürliche Abwehr des Wirtes abschwächen. Trotzdem müssen pathogene Pilze, wie die medizinisch bedeutende Hefe *Candida albicans*, über Virulenzfaktoren verfügen, die dem Mikroorganismus das Überleben auf und in einem Wirt sichern oder das Vordringen zu tieferen Geweben und Organen ermöglichen. Das Ziel der Forschungsprojekte der Nachwuchsgruppe „Pathogenitätsfaktoren bei Pilzinfektionen“ am Robert Koch-Institut (RKI) ist, solche Faktoren von Pilzen zu identifizieren und zu analysieren, von denen vermutet wird, dass sie bei einer Infektion eine wichtige Rolle spielen. Damit sollen nicht nur die Pathogenitätsmechanismen besser verstanden werden, sondern auch Ansatzpunkte für neue Medikamente gefunden werden. Schließlich gilt es, aufgrund der zunehmenden Resistenzen gegenüber den wenigen zur Verfügung stehenden Antimykotika, die Wirkungsweise existierender Medikamente zu verstehen.

Nach Schätzungen von Experten des Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, Niederlande) existieren weltweit mindestens 1 Mio. Pilzarten, von denen lediglich ca. 100.000 bis 200.000 Arten beschrieben sind. Der weitaus überwiegende Teil dieser Pilzarten lebt saprophytisch, d. h. durch Verwertung abgestorbener Organismen. Nur ein Bruchteil der Pilze hat die Fähigkeit, durch parasitäre Lebensweise andere Organismen zu gefährden. Während immerhin noch mehrere tausend Pilze als pflanzenpathogen gelten, werden beim Menschen nur 150 Arten als primäre Krankheitserreger gezählt [1]. Unabhängig von pilzlichen Allergenen und Mykotoxinen, die Krankheitssymptome verursachen können, werden klinisch vier Klassen von Mykosen unterschieden, die durch humanpathogene Pilze verursacht werden [2]:

1. primäre systemische Mykosen,
2. opportunistische (systemische) Infektionen,
3. subkutane Mykosen und
4. kutane Mykosen (Dermatomykosen).

Während primäre Systemmykosen (z. B. verursacht durch Pilze der Gattungen *Histoplasma* und *Coccidioides*) und subkutane Mykosen (z. B. *Sporothrix*) in Mitteleuropa selten sind, sind kutane und opportunistische Pilzinfektionen weltweit verbreitet. Schätzungsweise jeder dritte Deutsche leidet unter Fußpilz oder anderen durch Dermatophyten (z. B. Pilze der Gattung *Trichophyton* und *Mikrosporum*) verursachte Krankheiten. Opportu-

nistische Pilzinfektionen werden in Mitteleuropa vor allem durch *Candida*- und *Aspergillus*-Spezies mit den wichtigsten Vertretern *C. albicans* und *A. fumigatus* hervorgerufen. *A. fumigatus* ist ein ubiquitärer Pilz, dessen Sporen überall in der Umwelt nachzuweisen sind. Dagegen gilt *C. albicans* als obligat mit dem Menschen oder warmblütigen Tieren assoziiert. Mindestens jeder zweite Mensch ist Träger dieses Pilzes. Bei gesundem Immunsystem und intakter mikrobieller Flora gilt *C. albicans* als normaler und harmloser Kommensale der Schleimhäute und vor allem des Verdauungstraktes des Menschen. Abwehrschwäche, Verletzung natürlicher Barrieren oder Störung der mikrobiellen Flora des Wirtes können jedoch zur Folge haben, dass *C. albicans* durch ungehemmtes Wachstum vom Kommensalismus zum Parasitismus übergeht. Im Prinzip lassen sich *C. albicans*-Infektionen (Candidosen) in vier Stadien einteilen (Abb. 1; [3]). Die Kolonisierung der Haut und Schleimhaut (Stadium 1) stellt selbst noch keine Infektion dar, solange der Pilz von der normalen mikrobiellen Flora und dem Immunsystem kontrolliert wird. Die Besiedlung stellt jedoch eine Voraussetzung für eine Infektion dar. Kann *C. albicans* die normale mikrobielle Flora z. B. infolge einer antibakteriellen Therapie oder Immunschwäche überwuchern, kommt es zu den

Priv.-Doz. Dr. Bernhard Hube
Nachwuchsgruppe 4, Robert Koch-Institut,
Nordufer 20, 13353 Berlin,
E-Mail: hubeb@rki.de

Kolonisierung



Oberflächeninfektionen



Tiefe Infektionen



Systemische Infektionen



Nach Odds (1994). ASM News 60:313-18.

Abb. 1 ▲ Stadien einer *C. albicans*-Infektion. Infektionen mit *C. albicans* lassen sich in vier Stadien einteilen (Odds, 1994). Eine Kolonisierung stellt noch keine eigentliche Infektion dar, solange der Pilz durch die normale mikrobielle Flora (helle Kokken und Stäbchen) und ein intaktes Immunsystem kontrolliert wird. Kann der Pilz, z. B. nach antibakterieller Therapie, die mikrobielle Flora überwinden, kommt es zu den häufigen Oberflächeninfektionen von Haut und Schleimhaut. Dringt der Pilz in tiefere Gewebe ein, verursacht er tiefe Infektionen. Gelingt es den Pilzzellen schließlich, bei ernsthaften Störungen des Immunsystems in das Blutgefäßsystem vorzudringen, kann sich *C. albicans* über den ganzen Körper verteilen, praktisch alle Organe befallen und so systemische, lebensbedrohende Infektionen auslösen

sehr häufigen lokalen Schleimhautinfektionen, deren pseudomembranöse Form „Soor“ genannt wird (Stadium 2). Dringt der Pilz durch die oberen Schichten des Epithelgewebes, kann es zu tiefen Infektionen kommen (Stadium 3). Gelingt es *C. albicans* weiterhin, in das Blutgefäßsystem einzudringen, kann es vor allem bei schwer immungeschädigten Patienten schließlich zu lebensbedrohenden systemischen Candidosen kommen (Stadium 4). Für die starke Zunahme von *Candida*-Infektionen in den letzten Jahren ist eine Reihe von Faktoren verantwortlich, wie z. B. die breite Anwendung von Antibiotika und Immunsuppressiva sowie die Zunahme von Immungängelsyndromen, wie z.B. Aids oder Leukämien. Die dadurch bedingte häufigere und breitere (auch prophylaktische) Anwendung von Antimykotika hat zum vermehrten Auftreten von Resistenzen der pathogenen Hefepilze gegenüber den wenigen zur Verfügung stehenden Antimykotika geführt.

Offensichtlich ist es vor allem der Zustand des Wirts, der entscheidend dafür ist, ob es zu einer *Candida*-Infektion kommt oder nicht. Trotzdem muss *C. albicans* über Faktoren verfügen, die den

Pilzzellen ein Überleben auf der menschlichen Schleimhaut oder das Vordringen in tiefere Gewebe und Organe ermöglichen. Zu diesen Faktoren gehören Adhäsionsfaktoren, morphologische Flexibilität und hydrolytische Enzyme.

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, am Beispiel von *C. albicans* und verwandten Hefen mit molekularbiologischen Methoden aufzuklären, welche Faktoren humanpathogene Pilze benötigen, um Infektionen zu verursachen. Damit sollen nicht nur die Pathogenitätsmechanismen besser verstanden werden, sondern auch Ansatzpunkte für neue Medikamente gefunden werden. Weiterhin soll die Wirkungsweise bereits existierender Antimykotika untersucht werden.

Folgende Projekte werden in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet:

1. sekretorische Proteasen als Virulenzfaktoren von *C. albicans*,
2. Phospholipasen und Signaltransduktion,
3. Identifizierung und Analyse infektionsspezifischer Gene,
4. Wirkungsweise von Antimykotika,
5. regulatorische Proteasen von *Candida* spec.

Sekretorische Proteasen als Virulenzfaktoren von *C. albicans*

A. Felk, A. Albrecht, S. Beinhauer
(in Zusammenarbeit mit M. Kretschmar, T. Nichterlein, Mannheim, M. Schaller und H.C. Korting, München)

Sekretorische Aspartat-Proteasen gelten als maßgebliche Virulenzfaktoren von *C. albicans* und werden von zehn verschiedenen Genen (SAP1–10) kodiert [4]. Innerhalb der SAP-Genfamilie lassen sich die Gene in zwei relativ eng verwandte Gruppen (SAP1–3 und SAP4–6) und vier weniger ähnliche Gene (SAP7, SAP8, SAP9 und SAP10) einteilen. Alle Genprodukte sind jedoch typische Aspartat-Proteasen und haben konservierte Praepropeptide, Prozessierungsschnittstellen und Cystein-Reste für Disulfidbrücken [5]. Bei den erst kürzlich identifizierten Genen SAP9 und 10 fällt als Besonderheit auf, dass ihre korrespondierenden Proteine ungefähr 50 Aminosäuren länger sind als die anderen Saps [6]. Diese Verlängerungen bestehen aus einer C-terminalen hydrophoben und Serin-/Threonin-reichen Region, wie sie bei GPI- (Glycosyl-Phosphatidylinositol-) verankerten Proteinen typisch sind. Auch andere Kriterien deuten auf eine solche Verankerung, und es kann daher angenommen werden, dass Sap9 und Sap10 mit der Zelloberfläche assoziiert sind. Bereits vor 20 Jahren konnte durch Nachweis von Anti-Sap-Antikörpern in Seren von Candidose-Patienten [7] gezeigt werden, dass Sap-Proteasen während einer Infektion exprimiert werden, eine Voraussetzung für jeden Virulenzfaktor.

Warum aber braucht der Pilz zehn verschiedene Gene für einen Virulenzfaktor? Es ist denkbar, dass verschiedene Sap-Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben, abhängig von dem Stadium der Infektion exprimiert werden und dort entweder bestimmte Aufgaben übernehmen und/oder für die jeweilige Umgebung optimiert sind. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann müssten die SAP-Gene differenziell reguliert werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Expression der SAP-Genfamilie sowohl in vitro als auch in vivo relativ streng reguliert wird [8, 9]. Die Expression der SAP-Gene wird sowohl durch die Morphologie (Hefen- oder Hyphenform), als auch durch die Temperatur und den pH-

Wert des Mediums sowie durch die Anwesenheit von Induktoren beeinflusst. Damit kann der Pilz auch in sehr unterschiedlichen physiologischen Situationen Proteasen sezernieren, die an den einzelnen Infektionsschritten beteiligt sein könnten.

Bei der experimentellen Infektion von rekonstruierter Epidermis mit *C. albicans* (Abb. 2a) kann histologisch der Verlauf einer Infektion verfolgt werden, die einer oralen Infektion ähnelt. Zeitgleich kann mithilfe der Technik der RT-PCR ermittelt werden, welche SAP-Gene zu welchem Zeitpunkt dieser experimentellen Infektion exprimiert werden [9]. Sobald die ersten Läsionen in diesem Modell zu erkennen sind (s. Abb. 2b), wird auch die Expression von SAP1, 3 und 6 beobachtet. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Analyse von oralen Patientenproben.

Um zu untersuchen, ob einzelne Sap-Isoenzyme wichtig für die Pathogenese von Candidosen sind, wurden Mutanten hergestellt, bei denen die Gene SAP1-3 und SAP4-6 zerstört wurden [10, 11]. Bei experimentellen Infektionen mit diesen Mutanten stellte sich heraus, dass die Gene SAP1-3, nicht aber die hyphen-spezifischen Gene SAP4-6 für die oberflächliche Infektion essenziell sind [12]. Im Gegensatz dazu spielen aber SAP4-6 und nicht SAP1-3 eine entscheidende Rolle bei systemischen Infektionen, z. B. bei der Penetration des Pilzes in parenchymale Organe (Leber, Pankreas; [13, 14]). Diese Beobachtungen erklären auch, warum Inhibitoren der Aspartat-Protease einen schützenden Effekt bei experimentellen Infektionen haben (s. Abb. 2c; [15]). Die Proteasen von *C. albicans* sind also geeignete Angriffspunkte für therapeutische Interventionen.

Phospholipasen und Signaltransduktion

D. Kunze (in Zusammenarbeit mit D. Sanglard, Lausanne, Schweiz, und J. Dolan, Charleston, USA)

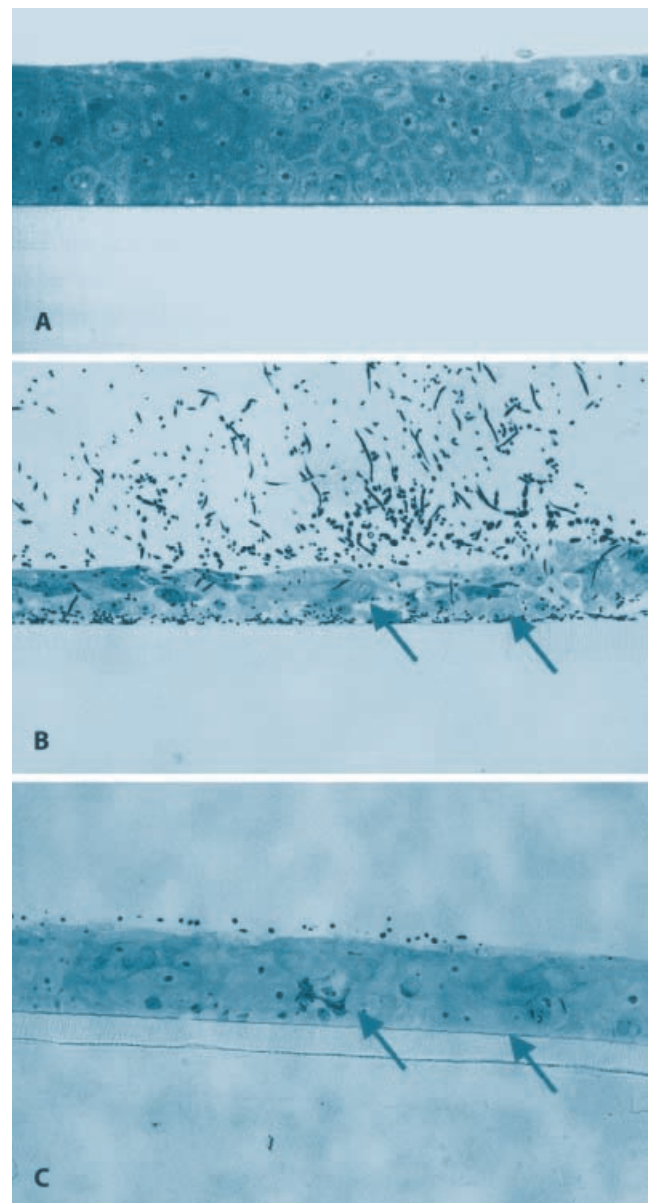
C. albicans besitzt die Fähigkeit, zwischen einer Hefe- und Myzelform wechseln zu können. Diese Fähigkeit ist von großer Bedeutung für die Virulenz des Pilzes. Die molekulare Regulation dieses Vorganges wird daher gegenwärtig intensiv untersucht. Die überwiegende Zahl der diesbezüglichen Arbeiten konzentriert sich je-

doch fast ausschließlich auf die Analyse der Rolle von MAP-Kinasen- und cAMP-gesteuerten Signaltransduktionswegen [16]. Im Rahmen unserer Projekte werden hingegen Untersuchungen über die Rolle von Lipid(signal)molekülen bei zellulären Vorgängen in *C. albicans* durchgeführt. Wir konnten erstmals zeigen, dass eine vermutlich intrazelluläre Phospholipase (Pld1) maßgeblich an der Myzelbildung beteiligt und damit für die Virulenz des Pilzes bei systemischen Infektionen wichtig ist (Abb. 3; [17]).

Zwischen dem nichtpathogenen Hefepilz *S. cerevisiae* und dem pathogenen Hefepilz *C. albicans* sind zahlreiche molekulare Regulationsprozesse und Proteine konserviert. Jedoch unterscheiden

sie sich häufig in ihrer Funktion. So dient der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg bei *S. cerevisiae* zur Regulation des „matings“ (sexuelle Vermehrung), während an ihm beteiligte Proteine in *C. albicans* den für die Virulenz wichtigen Dimorphismus (Hefe-Myzel-Übergang) steuern. Wahrscheinlich gilt dies auch für die zweite von uns untersuchte Phospholipase, einer Phospholipase C (Plc1). Bei *S. cerevisiae* wird sie mit der cAMP-vermittelten Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht. Die Funktion dieser Phospholipase C bei *C. albicans* ist hingegen noch nicht eindeutig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass sie auch hier an Signaltransduktionen beteiligt ist. Allerdings hat die Deletion des

Abb. 2a-c ► **Candida-Infektion von oraler Schleimhaut (RHE-Modell) und Schutz durch Proteaseinhibitoren.** In einem künstlichen Modell für orale Candidosen kann die Bedeutung von Virulenzfaktoren wie den sekretorischen Proteasen getestet werden. Nicht infiziertes Epithelgewebe zeigt einen intakten zusammenhängenden Zellverband (a), mit *C. albicans* infiziertes Epithel erscheint als erodiertes Gewebe mit „Vakuolenbildungen“ und ist durchsetzt mit Pilzzellen (b). Wird jedoch ein Proteaseinhibitor zugegeben, bleibt das Epithelgewebe weitgehend geschützt (c). (Fotos von M. Schaller, München)



Plc1-Gens bei *C. albicans* keine so drastischen Folgen wie bei *S. cerevisiae*. Es muss bei *C. albicans* also alternative („by-pass“) Reaktionswege geben, die den Verlust des Plc1-Gens kompensieren.

Weiterführende Versuche sollen:

1. die Regulation der Expression der Phospholipase-Gene und den Einfluss der Phospholipasen auf die bekannten Signaltransduktionswege untersuchen,
2. die unterschiedlichen Funktionen der Phospholipasen bei *S. cerevisiae* und *C. albicans* aufzeigen und
3. mögliche „by-pass“-Reaktionswege identifizieren, die es bei *S. cerevisiae* nicht gibt.

Die Analyse dieser bisher wenig untersuchten Aspekte der Regulation zellulärer Prozesse bei *C. albicans* wird die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen einem pathogenen und einem verwandten, aber nichtpathogenen Pilz, aufzeigen. Möglich erscheint auch, dass Phospholipasen vor allem für die Bereitstellung und Modifikationen von Molekülen (z. B. den Bausteinen der Phospholipide) nötig sind, die bei Dynamik der zellulären Vorgänge (z. B. Expansion der Zellmembran bei Wachstum) eine wichtige Funktion haben.

Identifizierung und Analyse infektionsspezifischer Gene

C. Fradin (in Zusammenarbeit mit neun europäischen Partnern im Rahmen eines EU-Projekts)

Neben der gezielten Untersuchung von Faktoren, von denen bereits bekannt ist oder aber vermutet wird, dass sie an der Pathogenese von *C. albicans* beteiligt sind, ist die Suche nach solchen Genen, die spezifisch während einer Infektion exprimiert werden, ein zentrales Thema unserer Arbeitsgruppe.

Seit Mitte 2000 ist das Genom (haploid: 16 Mb) von *C. albicans* vollständig sequenziert und steht der Öffentlichkeit zur Verfügung (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>). Erste Untersuchungen der Sequenzdaten haben ergeben, dass *C. albicans* über ca. 8.000 Gene verfügt, also gut 2.000 Gene mehr trägt als die nahe verwandte apathogene Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Sind dies Gene, die an der Pathogenese von *C. albicans* beteiligt sind? Um diese Frage zu untersuchen, werden bei uns zwei Technologien eingesetzt. Zunächst werden sowohl aus Zellen von *C. albicans*, die an einer Infektion beteiligt sind, als auch aus Zellen, die ohne Wirtkontakt im Labor angezogen worden sind, die Boten RNAs (mRNAs) isoliert. Die mRNAs werden in cDNAs übersetzt, und in einem Subtraktionsverfahren [18] werden solche cDNA-Moleküle herausgefiltert, die nur aus der mRNA-Population der infizierenden Zellen stammen können. Diese cDNA-Moleküle werden kloniert und weiteranalysiert. In einem zweiten Verfahren wird die gesamte cDNA der infizierenden Zellen markiert und als Sonde für Mikroarrays eingesetzt, auf denen eine große Anzahl einzelner Gene an definierten Positionen fixiert ist (Abb. 4). Erzeugt die cDNA-Sonde aus den infizierenden Zellen ein Signal an einer bestimmten Position, die zum Vergleich

eingesetzte cDNA aus im Labor angezogenen, nicht infizierenden Zellen aber keines, kann gefolgert werden, dass dieses Gen während einer Infektion exprimiert wird. Für Faktoren, die an der Pathogenese beteiligt sind, ist die Expression ihrer korrespondierenden Gene in infizierenden Zellen eine grundsätzliche Voraussetzung. Jedoch lässt sich aus der bloßen Expression nicht zwingend schließen, dass die identifizierten Gene auch tatsächlich für Virulenzfaktoren kodieren. Weitere Experimente, bei denen z. B. diese Gene ausgeschaltet werden, um zu überprüfen, ob ihr Verlust die Virulenz des Pilzes abschwächt, müssen als Beweis folgen.

Wirkungsweise von Antimykotika

M. Niewerth (in Zusammenarbeit mit K. Tintelnot, M. Seibold, Berlin, und H.C. Korting, München)

Zur Therapie von *Candida*-Mykosen stehen verschiedene Antimykotika aus mehreren Wirkstoffklassen zur Verfügung [19]. Von diesen gehört Fluconazol zu den häufig eingesetzten Substanzen, und es wird oft auch bei lebensbedrohlichen Mykosen angewendet. Fluconazol entfaltet seine Wirkung über eine Hemmung der Ergosterolsynthese des Pilzes. Ergosterol ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmembranen, kommt jedoch nicht beim Menschen vor. Resistenzentwicklungen des Pilzes gegenüber Fluconazol gefährden den Therapieerfolg jedoch in zunehmendem Maße, wobei durch das Auftreten von Kreuzresistenzen auch die Anwendung anderer Azolantimykotika limitiert wird. Ciclopiroxolamin ist ebenfalls ein häufig eingesetztes Antimykotikum. Im Gegensatz zu anderen Substanzklassen, wie z. B. den Azolen, versteht man die Wirkungsweise des Ciclopiroxolamins jedoch nur ansatzweise. Bekannt ist, dass keine Kreuzresistenzen zwischen beiden Substanzen auftreten. Die antimykotische Wirkung von Ciclopiroxolamin könnte z. B. auf eine allgemein eingeschränkte Lebensfähigkeit des Pilzes, auf seine höhere Sensibilität gegenüber dem menschlichen Immunsystem und auch auf eine reduzierte Fähigkeit, bestimmte Virulenzfaktoren zu produzieren, zurückzuführen sein.

Ziel unseres Projekts ist es, die Wirkungsweise von Ciclopiroxolamin auf

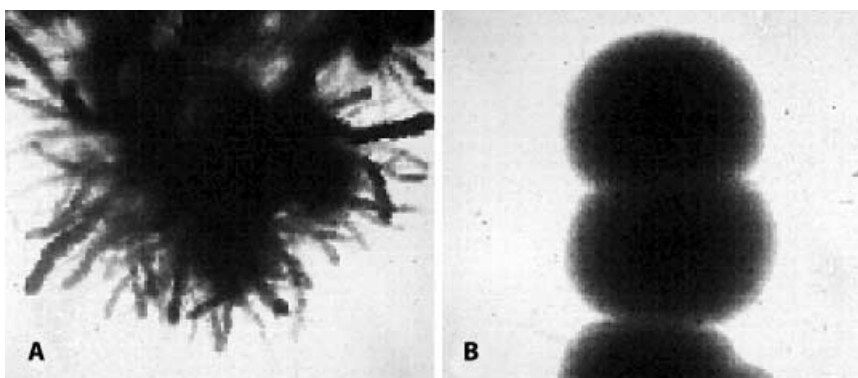


Abb. 3a,b ▲ Myzel bildende Kolonie von *C. albicans* und glatte Kolonien von Phospholipase-D-Mutante. Wild-Typ-Zellen (a) und Mutanten, denen das PLD1-Gen fehlt (b), wurden auf myzelinduzierendem Agar ausgestrichen. Nur die Wild-Typ-Kolonien waren unter diesen Umständen noch dazu in der Lage, filamentöse Formen zu bilden

der Basis von Genexpressionsversuchen näher zu analysieren. Dabei wird nicht nur untersucht, ob unter Einfluss von Ciclopiroxolamin die Expression von Genen für essenzielle Proteine oder die Expression wichtiger Virulenzfaktoren vermindert wird, sondern es sollen auch die tatsächlichen Zielmoleküle (Targets) dieses Antimykotikums identifiziert sowie die Expression bekannter Resistenzgene untersucht werden. Es wird angenommen, dass durch die Identifizierung der Zielmoleküle potenzielle Ansatzpunkte für neue Wirkstoffe ermittelt werden können. Kürzlich ist dieses bereits in ähnlichen Versuchsansätzen mit Azolen gelungen [20].

Aufgrund der bereits vorliegenden Ergebnisse können erste Aussagen über die Wirkungsweise von Ciclopiroxolamin auf *C. albicans* bzw. über die Beeinflussung dieser Hefe durch eine subinhibitorische Konzentration von Ciclopiroxolamin getroffen werden:

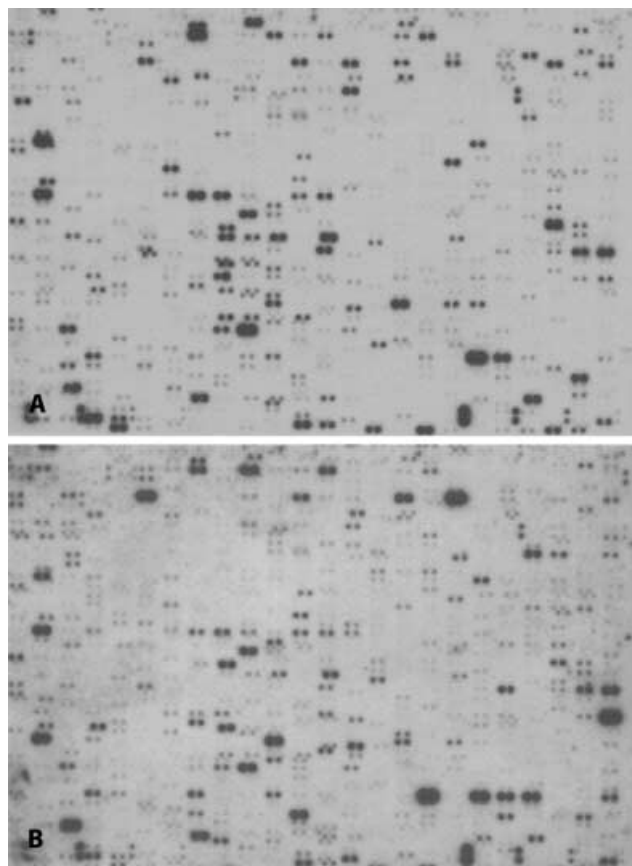
1. Die Expression ausgesuchter lebenswichtiger (essenzieller) Gene, wie z. B. des Aktin-Gens, wird durch Ciclopiroxolamin nicht beeinflusst.
2. Die Expression von einigen Virulenzgenen ist gegenüber unbehandelten Zellen vermindert. Die therapeutische Wirkung von Ciclopiroxolamin ist also möglicherweise auch auf die abgeschwächte Virulenz der Pilzes zurückzuführen.
3. Überraschenderweise werden durch Ciclopiroxolamine auch potenzielle Resistenzgene aktiviert. Die bisherigen Versuche haben jedoch gezeigt, dass eine erhöhte Expression dieser Gene keine erhöhte Resistenz gegenüber Ciclopiroxolamin erzeugt.
4. Das Expressionsmuster von Genen des Eisenstoffwechsels deutet darauf hin, dass Ciclopiroxolamine ihre antimykotische Wirkung vor allem durch die Erzeugung eines Eisenmangels entfalten.

Regulatorische Proteasen von *Candida*

O. Bader, A. Albrecht, S. Beinhauer

Neben Infektionen mit *C. albicans* sind in den letzten Jahren immer häufiger auch Infektionen mit weiteren *Candida*-Arten aufgetreten. Vor allem Infektionen mit *C. glabrata* haben stark zugenom-

Abb. 4a,b ▶ **Mikroarray-Expressionsexperimente mit infizierenden *C. albicans*-Zellen. Um untersuchen zu können, welche Gene des Pilzes bei einer Infektion exprimiert werden, wurde cDNA von infizierenden Zellen (a) und cDNA von nicht infizierenden Zellen (b) als Hybridisierungssonde für Mikroarrays mit 2.000 Genen verwendet. Jeder schwarze Punkt signalisiert, dass ein bestimmtes Gen exprimiert wurde. Unterschiede im Hybridisierungsmuster sind deutlich zu erkennen**



men. Diese Hefe zeichnet sich nicht nur durch eine relativ hohe natürliche Resistenz gegenüber einigen etablierten Antimykotika aus, sondern besitzt wie *C. albicans* die Fähigkeit, innerhalb kurzer Zeit neue Resistenzmechanismen auszubilden. Aufgrund dieser Resistenzen ist die Therapie der Candidosen mit einzelnen Chemotherapeutika schwierig, sodass sich in der Klinik die Kombinationstherapie durchgesetzt hat. Um einen möglichst hohen synergistischen Effekt zu erzielen, kombiniert man häufig Stoffe, die auf verschiedenen Wegen eine inhibierende Wirkung auf die Pilzzellen ausüben. Ein Beispiel ist die Kombination von Amphotericin B, welches durch Bindung an das Ergosterol die Zellmembran destabilisiert, mit 5-Flucytosin, welches mit der RNA der Zellen interagiert. Das erhöhte Auftreten von Candidosen und deren erschwerte Therapie durch das verstärkte Vorkommen resistenter Stämme macht es notwendig, nach neuen Zielmolekülen für Medikamente zu suchen.

Ein potenzielles Zielmolekül ist das Kex2-Protein [21]. Es handelt sich um eine im Trans-Golgi-Netzwerk (TNG) lo-

kalisierte, regulatorische Protease mit einem relativ großen Substratspektrum. Ihre Funktion umfasst die proteolytische Spaltung bestimmter Proteine an Lysin-Arginin-Motiven. Die Spaltung bewirkt die Aktivierung dieser Proteine. Bei *C. albicans* werden durch das Kex2-Protein bereits bekannte Virulenzfaktoren wie die sekretorische Aspartatprotease Sap2 und das in der Hyphenwand lokalisierte Protein Hwp1, welches zur Adhäsion an humanen Epithelzellen benötigt wird [22], aktiviert. Obwohl es sich bei dem KEX2-Gen nicht um ein lebensnotwendiges Gen handelt, hängt die Funktionsfähigkeit einiger Virulenzfaktoren, und somit die Pathogenität des Pilzes, direkt von der korrekten Prozessierung der Faktoren durch Kex2 ab. Im Rahmen unserer Untersuchungen haben wir das KEX2-Gen von *C. glabrata* isoliert und Pilzmutanten erzeugt, denen dieses Gen fehlt [23]. Um zu untersuchen, ob sich das Kex2-Protein als Ziel für eine antimykotische Therapie eignet, haben wir die KEX2-defizienten Stämme auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Gruppen von Antimykotika und anderen Zellgiften, im Vergleich

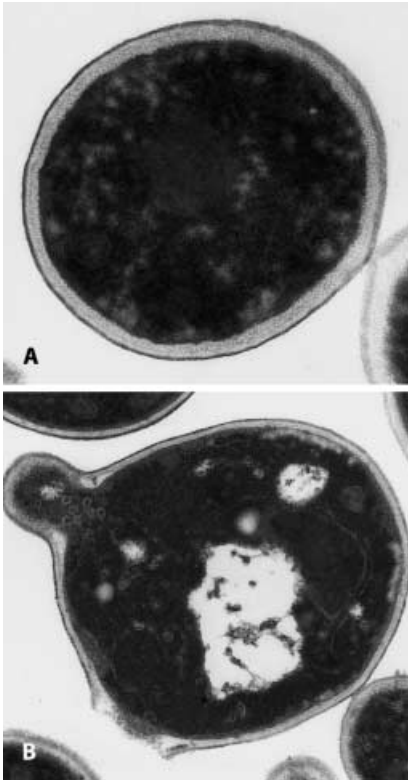


Abb. 5a,b ▲ Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. glabrata*-Kex2-Mutanten ohne (a) und mit (b) Itraconazol-Behandlung. Das KEX2-Gen ist für die Modifikation von Proteinen notwendig, die für die Zelloberfläche wichtig sind. Wird in einer Zelle das KEX2-Gen entfernt, ist sie hypersensitiv gegenüber Azolen (Medikamente, die die Zellmembran angreifen). Eine Kombination von Kex2-Inhibitoren und Azolen würde also die Wirkung der Azole verstärken. (Foto von M. Schaller, München)

zu Wildtyp-Stämmen, untersucht. Eine deutlich erhöhte Sensitivität konnte gegenüber dem Antimykotikum Amphotericin B, dem Morpholin Amorolfiin und allen fünf untersuchten Azolderivaten beobachtet werden (Abb. 5), jedoch nicht gegenüber Pyridinderivaten und 5-Fluorocytosin sowie dem Zellgift Cycloheximid. Eine erhöhte Sensitivität der Mutanten konnte demnach ausschließlich gegenüber solchen Wirkstoffen beobachtet werden, welche die Integrität der Zellwand oder der Plasmamembran negativ beeinflussen. Es bieten sich prinzipiell zwei verschiedene Erklärungsmodelle für diese Beobachtung an. Zum einen könnte es sein, dass Kex2 an der Prozessierung von Transportproteinen („multiple drug resistance“-Proteine) beteiligt ist, die für eine Entgiftung dieser Wirkstoffe verantwortlich sind. Sequenzanalysen in den zur Verfügung ste-

henden Datenbanken zeigten aber, dass diese Proteine aus verschiedenen *Candida*-Arten keine für die Prozessierung durch Kex2 notwendige Lysin-Arginin-Schnittstelle besitzen. Zum anderen könnte es sein, dass ein oder mehrere Proteine der Zellwand oder der Zellwandsynthese nicht mehr aktiviert werden. In der Tat konnten in der Datenbank der Genomprojekte von *S. cerevisiae* und *C. albicans* eine Reihe neuer potenzieller Substratproteine identifiziert werden, deren Dysfunktion ähnliche Phänotypen hervorruft. Darunter befinden sich Proteine der GPI-Anker-Synthese, Strukturproteine der Zellwand und weitere extrazelluläre Proteasen. Diese Hypothese wird auch von lichtmikroskopischen Beobachtungen gestützt: Zellen der KEX2-defizienten Stämme neigen zur Bildung von Aggregaten. Diese Neigung deutet auf Schwierigkeiten der Separation der Zellen nach der Zellknospung, was wiederum auf Fehler im Aufbau der Zellwand hinweist. Auch humane Zellen besitzen Kex2-ähnliche Proteine, die sog. „Prohormon Convertasen“ (PC, PACE), welche u. a. in der Prozessierung von Neuropeptiden und Hormonen eine Rolle spielen. Die klinische Erfahrung mit dem Einsatz von Hemmern der Aspartatproteasen bei HIV, welche gleichzeitig einen guten therapeutischen Effekt auf Begleitinfektionen mit *C. albicans* haben [15], zeigt jedoch, dass sich spezifische Proteaseinhibitoren entwickeln lassen, die nur geringen Einfluss auf die humanen Proteinanaloga haben. Aus unseren Untersuchungen schließen wir, dass die spezifische Hemmung von Kex2-Proteasen in Kombination mit den oben genannten inhibitorischen Wirkstoffen eine neue Strategie der Chemotherapie bei Candidosen sein könnte.

Ausblick

Pilzinfektionen gehören zu den Infektionskrankheiten, deren vermehrtes Auftreten zu befürchten ist. Am Beispiel des wichtigsten humanpathogenen Pilzes *C. albicans* konnten die Mitarbeiter der Nachwuchsgruppe zeigen, dass bestimmte Faktoren des Pilzes, wie z. B. sekretorische Proteasen, entscheidend an der Pathogenese des Pilzes beteiligt sind. Das Verständnis des Infektionsvorganges sowie die Identifizierung der Faktoren, die für eine Infektion essenziell sind, sind eine wichtige Voraussetzung, um

Pilzinfektionen erfolgreich bekämpfen bzw. verhindern zu können. Es ist daher das erklärte Ziel unserer Gruppe, durch neue Technologien im Bereich der „Functional Genomics“ detaillierte Erkenntnisse über den Infektionsvorgang von humanpathogenen Pilzen zu gewinnen, neue Virulenzfaktoren und neue Zielmoleküle für Antimykotika zu identifizieren sowie die Wirkungsweise bereits bekannter Antimykotika besser zu verstehen.

Danksagungen. Wir bedanken uns bei M. Schaller, H.C. Korting, (München), M. Kretschmar, T. Nichterlein (Mannheim), F. Mühlshlegel (Canterbury, UK), N. Gow, A. Brown, F. Odds (Aberdeen, UK), J. Naglik (London, UK), J. Dolan (Charleston, USA), den Arbeitsgruppen von W. Schäfer und E. Heinz (Hamburg) und K. Tintelnot und M. Seibold und allen anderen Kollegen des Robert Koch-Instituts (Berlin) für eine gute Zusammenarbeit in den aufgeführten Projekten. Unsere eigenen Forschungen werden unterstützt durch das Robert Koch-Institut, die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hu 528/7 und Hu 528/8), die Europäische Gemeinschaft (Project QLK2-CT2000-795) und das Dr. Manfred Plempel Stipendium.

Literatur

1. Kwon-Chung KJ, Bennett JE (1992) Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia London
2. Kayser FH (1993) Mykologie. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Lindenmann J (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie, 8. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart New York, S 275–299
3. Odds FC (1994) *Candida* species and virulence. ASM News 60:313–318
4. Hube B, Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 147:1997–2005
5. Hube B (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. Curr Top Med Mycol 7:55–69
6. Hube B, Naglik J (in press) Chapter 9: Extracellular hydrolases. In: Calderone R (ed) *Candida and candidiasis*. ASM
7. MacDonald F, Odds FC (1980) Purified *Candida albicans* proteinase in the serological diagnosis of systemic candidosis. JAMA 243:2409–2411
8. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. Mol Microbiol 14:87–99
9. Schaller M, Schäfer W, Korting HC, Hube B (1998) Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. Mol Microbiol 29:605–615

10. Hube B, Sanglard D, Odds FC et al. (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65:3529–3538
11. Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds FC, Gow NA (1997) A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* 65:3539–3546
12. Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W, Hube B (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 34:169–180
13. Kretschmar M, Hube B, Bertsch T et al. (1999) Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* 67:6637–6642
14. Felk A, Kretschmar M, Schaller M et al. (unpublished) *Candida albicans* hyphal formation and the expression of hyphal associated proteinases are required for the invasion of parenchymal organs
15. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B (1999) Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2038–2042
16. Ernst JF (2000) Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146:1763–1774
17. Hube B, Hess D, Baker CA, Schaller M, Schafer W, Dolan JW (2001) The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* 147:879–889
18. Hubank M, Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22:5640–5648
19. Bastert J, Schaller M, Korting HC, Evans EG (2001) Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int J Antimicrob Agents* 17:81–91
20. De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, Vanden Bossche H (2001) Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1660–1670
21. Fuller RS, Brake A, Thorner J (1989) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1434–1438
22. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283:1535–1538
23. Bader O, Schaller M, Klein S et al. (2001) The KEX2 gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity. *Mol Microbiol* 41:1431–1444

V. Franziskus, K. Wolf, E. Brandt (Hrsg.)

Handbuch der Altlastensanierung (HdA)

Ergänzbare Loseblattwerk in vier Ordnern, 21.–26. Ergänzungslieferung (einschl. einer up-date zur Volltext-CD-ROM) (Juli 2000 bis September 2001), 4716 S., C.F. Müller, Hüthig Fachverlage, Heidelberg, ISBN 3-81149700-6, € 116,60

In diesen Loseblatt-Lieferungen findet der Leser die bewährte Kombination von Originalbeiträgen zu grundsätzlichen Erkenntnissen über Sanierungserfordernissen und -möglichkeiten, zu Sanierungserfahrungen an einzelnen Standorten, über Erfahrungen aus dem Flächenrecycling und zu weiteren allgemeinen und auch speziellen, z.B. auch rechtlichen, Komplexen. Der 25. Ergänzungslieferung liegt eine CD-ROM mit einem ersten Update der Volltextversion des vierbändigen Werkes bei.

Mit Standorterfahrungen macht die LCKW-Sanierungen Edenkoben (Funnel and Gate), Rheine (reaktive Wand) und Kassel (Thermostrip) bekannt. Die Betrachtung konventioneller und innovativer In-situ-Sanierungen ehemaliger Gaswerksstandorte empfiehlt aktive Sanierungs- und Reinigungsverfahren in Kombination mit Einkapselungen.

Grundsatzarbeiten untersuchten die Bodenbelastungen durch Bombenzerscheller, die Eignung der Dampfinjektion zur In-situ Sanierung der ungesättigten Bodenzone und die tensidgestützte Sanierung von kontaminiertem Boden und Bauschutt, wie auch die Modellierung der Ausbreitung von Weichgelen bei der Abkapselung von Altlasten durch Injektionen. Zusammenfassende Erfahrungen bieten über Bodenluftsanierungen die „Arbeitshilfe Bodenluftsanierung“ des LUA NRW, und zu Vergleichen über LCKW-Grundwassersanierungen eine Gegenüberstellung von „Pump and Treat“ und „Einsatz reaktiver Systeme“. Außerdem werden eine monetäre Bewertung des Altlastenrisikos, Erwägungen zur

Nutzungen-Kosten-Untersuchung als Kriterium für die Sanierungsentscheidung und Optimierungsstrategien für die Bauwerksdemontage vorgelegt. Erkenntnisse zum Flächenrecycling stellt der Bericht über die Reaktivierung des Geländes früherer Seilwerke (Hattingen) für den Wohnungsbau dar. Grundsätzliche systematische Erkenntnisse bieten Erwägungen über veränderte Rahmenbedingungen für Bauleitplanung und Bodenschutz durch die neueren bundesgesetzlichen Regelungen. Beispiele aus der einschlägigen Rechtsprechung, Erörterungen zum Umfang der Zustandshaftung des Eigentümers bei Altlastensanierungen und zur verfassungsrechtlichen Begrenzung der Zustandsstörerhaftung, zum bodenrechtlichen Umgang mit Rüstungsaltlasten und zum Datenschutzrecht bei Altlastenkatastern runden den Komplex Bodenschutz- und Altlastenrecht ab.

Als wichtiges Zitat von Verordnungen und dergleichen werden folgende Abdrucke geboten: Thüringisches Abfallwirtschafts- und Altlastengesetz (15.6.1999); Thür.VO zur Verdachtsflächendatei (22.3.1998); baufachliche Richtlinien für die Planung und Ausführung der Sanierung von schädlichen Bodenveränderungen und Grundwasserunreinigungen (BMVBW, BMVG); Hamburgisches Bodenschutzgesetz 820.2.2001).

G. Milde (Berlin)