

**Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies  
von *Candida albicans* -  
ein potentieller Virulenzfaktor**

**D i s s e r t a t i o n**

**zum Erlangen des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christina Sander, geb. Schröter  
geboren am 04. 11. 1974 in Jena

Gutachter

1. Prof. Dr. Wollina, Jena
2. Prof. Dr. Wiederanders, Jena
3. PD Dr. Nenoff, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.04.2001

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. CANDIDA ALBICANS  | 1         |
| 1.1.1. <i>Taxonomie und Fortpflanzung</i>                              | 1         |
| 1.1.2. <i>Morphologie</i>  | 2         |
| 1.1.3. <i>Pathophysiologie von Candida-albicans-Infektionen</i>        | 3         |
| 1.1.4. <i>Mechanismen der Wirtsabwehr</i>                              | 4         |
| 1.1.5. <i>Pathogenitätsfaktoren von Candida albicans</i>               | 5         |
| 1.2. REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)                                  | 10        |
| 1.2.1. <i>Allgemeine Aspekte</i>                                       | 10        |
| 1.2.2. <i>Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von Candida albicans</i> | 12        |
| 1.3. NACHWEISMETHODEN  | 14        |
| 1.3.1. <i>Chemilumineszenz</i>   | 14        |
| 1.3.2. <i>Reduktion von Cytochrom c</i>                                | 15        |
| 1.4. TERBINAFIN ALS ANTIMYKOTIKUM UND RADIKALFÄNGER                    | 16        |
| 1.5. AUFGABENSTELLUNG UND ZIEL   | 17        |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>18</b> |
| 2.1. CHEMIKALIEN   | 18        |
| 2.2. CANDIDA ALBICANS  | 19        |
| 2.2.1. <i>Stämme und Kulturbedingungen</i>                             | 19        |
| 2.2.2. <i>Hypheninduktion</i>  | 21        |
| 2.3. ZELLZAHLBESTIMMUNG UND WACHSTUMSKURVEN                            | 22        |
| 2.4. PROTEINBESTIMMUNG   | 24        |
| 2.5. CHEMILUMINESZENZMESSUNGEN   | 25        |
| 2.6. REDUKTION VON CYTOCHROM C   | 25        |
| 2.7. UNTERSUCHUNGEN MIT TERBINAFIN                                     | 26        |
| 2.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG   | 27        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. ERGEBNISSE</b>   | <b>28</b> |
| 3.1. VORUNTERSUCHUNGEN   | 28        |
| 3.1.1. <i>Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven</i>           | 28        |
| 3.1.2. <i>Hyphenbildung</i>                                    | 29        |
| 3.1.3. <i>Proteinbestimmung</i>                                | 32        |
| 3.2. UNTERSUCHUNGEN DES VIRULENTEN STAMMES 3153A               | 34        |
| 3.2.1. <i>Chemilumineszenzmessungen</i>                        | 34        |
| 3.2.2. <i>Reduktion von Cytochrom c</i>                        | 36        |
| 3.2.3. <i>Einfluß der Terbinafinzugabe auf die ROS-Bildung</i> | 38        |
| 3.3. VERGLEICH DER STÄMME CA6 UND VIR3                         | 40        |
| <b>4. DISKUSSION</b>   | <b>42</b> |
| 4.1. VORUNTERSUCHUNGEN   | 43        |
| 4.2. ROS-BILDUNG UND DIMORPHISMUS                              | 44        |
| 4.3. EINFLUß VON TERBINAFIN AUF DIE ROS-BILDUNG                | 46        |
| 4.4. ROS-BILDUNG UND VIRULENZ                                  | 47        |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>                                      | <b>49</b> |
| <b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>                                 | <b>51</b> |
| <b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>                                | <b>67</b> |
| <b>8. ANHANG</b>   | <b>69</b> |
| 8.1. DANKSAGUNG  | 69        |
| 8.2. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG                                  | 70        |
| 8.3. LEBENSLAUF  | 71        |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 3153A                         | <i>Candida-albicans</i> -Stamm 3153A                                    |
| BCA                           | Bicinchonininsäure  |
| BSA                           | Bovines Serumalbumin  |
| CA6                           | <i>Candida-albicans</i> -Stamm CA6                                      |
| Cl                            | Chemilumineszenz  |
| cpm                           | Counts per Minute   |
| DMSO                          | Dimethylsulfoxid  |
| FKS                           | Fetales Kälberserum   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| KRPG                          | Krebs-Ringer-Phosphat-Glukose-Puffer                                    |
| Lc                            | Lucigenin   |
| ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Superoxidanionenradikal   |
| OD                            | Optische Dichte   |
| ·HO                           | Hydroxylradikal   |
| PBS                           | Phosphate Buffered Saline, Phosphat gepufferte NaCl-Lösung              |
| PMNL                          | Polymorphkernige neutrophile Leukozyten                                 |
| ROS                           | Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies                     |
| SAP                           | Secreted Aspartyl Proteases, sekretorische Aspartatproteasen            |
| SOD                           | Superoxiddismutase  |
| T                             | Terbinafin  |
| U                             | Units   |
| VIR3                          | <i>Candida-albicans</i> -Stamm VIR3                                     |
| YEPG                          | Yeast Extract Peptone Glucose Medium, Hefeextrakt-Pepton-Glukose-Medium |

## 1. Einleitung

### 1.1. *Candida albicans*

*Candida albicans* ist der wichtigste Vertreter der humanpathogenen Hefepilze. Eine wesentliche Eigenschaft dieser Hefe ist die Fähigkeit, bei Temperaturen von 37° bis 40°C wachsen zu können (Weber 1993, Odds 1988).

*Candida albicans* kommt in der freien Natur nicht ubiquitär vor. Schleimhäute des Verdauungstraktes des Menschen und der warmblütigen Tiere sind der primäre Standort dieser Hefeart. Auffällig ist jedoch ihre multilokale Verbreitung, daß heißt der oftmals gleichzeitige Nachweis von *Candida albicans* in Mundhöhle, Stuhl, Urin und auf den Genitalschleimhäuten (Jehn 1997). Der hefebesiedelte gesunde oder kranke Wirtsorganismus ist die Hauptinfektionsquelle, während es sich bei den relativ seltenen *Candida-albicans*-Nachweisen außerhalb von Mensch und Tier stets um Kontaminationen durch Sekrete oder Exkrete von besiedelten oder infizierten Wirtsorganismen handelt. *Candida albicans* stellt demzufolge einen Erreger von primären, meist endogenen, seltener exogenen Mykosen dar (Weber 1993).

#### 1.1.1. Taxonomie und Fortpflanzung

Die taxonomische Zuordnung betrachtet *Candida albicans* als eine imperfekte, daß heißt asporogene und asexuelle Hefe, die in der Lage ist, Pseudohyphen zu bilden (Kurtzman und Fell 1998, Shepherd 1985). Pseudohyphen sind elongierte Hefezellen, die durch einen Sprossungsvorgang entstehen und nicht separiert werden (Odds 1985). Der Organismus ist meist diploid und heterozygot, aber auch haploide und homozygote Varianten wurden beschrieben (Bodey 1993, Scherer und Magee 1990).

Die Fortpflanzung erfolgt bei Hefepilzen durch asexuelle Sprossung bzw. Knospung. Sprossung bedeutet das Auswachsen einer blasenförmigen Tochterzelle (Knospe) an der Peripherie der Mutterzelle. Nach Ablösen der Tochterzelle bleiben ultrastrukturell nachweisbare Sproßnarben zurück (Weber 1993). *Candida albicans* ist als dimorpher Organismus in der Lage, bei bestimmten Umweltbedingungen (z.B. Vorhandensein von Serum, Temperatur von 37 °C) Keimschläuche und Hyphen zu bilden (Odds 1988).

## 1.1.2. Morphologie

*Candida albicans* zählt wie alle Pilze zu den Eukaryoten. Diese verfügen über einen echten Zellkern und sind durch Membranen in Reaktionsräume gegliedert. Der Zellkern ist durch die Kernhülle gegen das Zytoplasma abgegrenzt (Abb. 1). Im Unterschied zu pflanzlichen Zellen fehlen den Hefen als heterotrophen Organismen Zellorganellen wie Chromoplasten oder andere Plastiden. Sie besitzen aber Zellwände und unterscheiden sich somit von tierischen Zellen (Weber 1993).

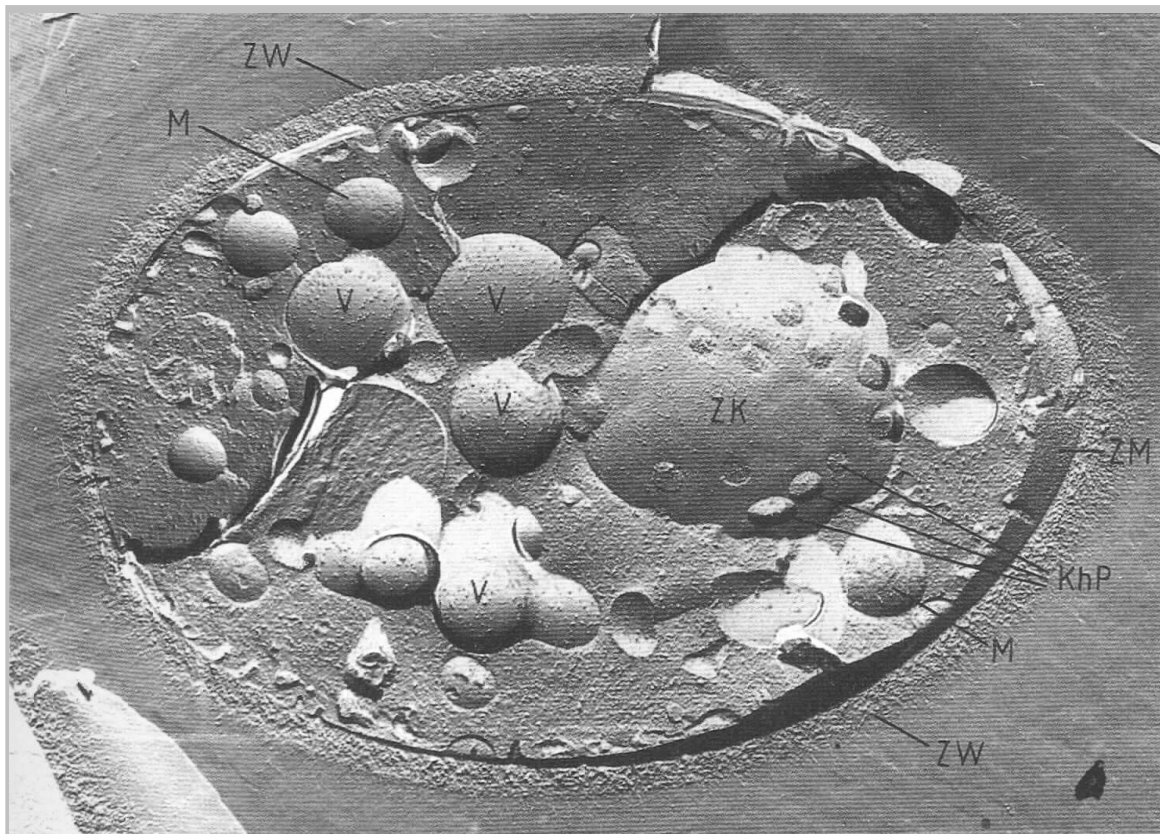


Abb. 1: Zelle von *Candida albicans*, elektronenmikroskopische Aufnahme, medianer Gefrierbruchschnitt (Vergrößerung 1: 30 400). Nach Weber 1993.  
 KhP: Kernhüllenporen, M: Mitochondrien, V: Vakuolen, ZK: Zellkern,  
 ZM: Zytoplasmamembran, ZW: Zellwand.

*Candida albicans* besitzt eine mehrschichtige Zellwand, die aus Glucan, Chitin, Mannanproteinen und einer äußeren fibrillären Wandschicht besteht, die für die adhärenen Eigenschaften verantwortlich gemacht wird (Shepherd 1987). Mitochondrien sind als zytoplasmatische Organellen bei allen Eukaryoten prinzipiell gleichartig organisiert und für die Zellatmung verantwortlich (Yamaguchi 1974).

### 1.1.3. Pathophysiologie von *Candida-albicans*-Infektionen

Es gibt eine Vielzahl von prädisponierenden Faktoren, die das Entstehen einer *Candida-albicans*-Infektion begünstigen (Odds 1994, Ghannoum 1988). Im wesentlichen sind beteiligt:

- Diabetes mellitus - Überangebot an Kohlenhydraten
- Antibiotikabehandlung - Beeinflussung der bakteriellen Standortflora
- Östrogentherapie/Schwangerschaft - Veränderung pH-Wert und vaginale Standortflora
- Chemotherapie/Radiatio - Veränderung bakterielle Standortflora/Immunsuppression
- Operative Eingriffe - Zerstörung physiologischer Gewebsbarrieren
- Immunsuppression - Reduktion Neutrophilenzahl/Immunmodulation
- HIV-Infektion - Veränderung T-Zell-Immunität

Infektionen treten vor allem an den Schleimhäuten des Mundes, des Ösophagus und der Vagina als mucocutane Candidose sowie in intertriginösen Bereichen als cutane Candidose auf. Bei verstärkter Immundefizienz kann es zum Befall innerer Organe bis hin zur lebensbedrohlichen disseminierten *Candida*-Infektion kommen (Cutler 1991, Odds 1988). In Abhängigkeit von den Abwehrlage des Wirtes nutzt *Candida albicans* verschiedene sogenannte Pathogenitätsfaktoren (Tab. 1), auf deren Bedeutung in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

| <b>Mechanismen der Wirtsabwehr</b>     | <b>Pathogenitätsfaktoren von <i>Candida albicans</i></b> |
|--|--|
| • Epidermale Proliferation             | • Dimorphismus   |
| • T-Zell-Immunität                     | • Adhärenz   |
| • Phagozytose durch Keratinozyten      | • Thigmotropismus  |
| • Sekretion antimykotischer Substanzen | • Proteasenbildung                                       |
| • Sekretion von Immunglobulinen        | • Phänotypisches Switching                               |
| • Mikrobielle Standortflora            | • Synergismus mit Bakterien                              |
| • Humorale Immunabwehr                 | • Schutz vor Phagozytose                                 |

Tab. 1: Potentielle Pathogenitätsfaktoren von *Candida albicans* und epidermale bzw. epitheliale Wirtsabwehr in der Pathogenese von *Candida*-Infektionen.  
Nach Odds 1994.



#### 1.1.4. Mechanismen der Wirtsabwehr

Epidermale und epitheliale Oberflächen sind normalerweise gegen eine mikrobielle Invasion geschützt, wobei für *Candida*-Infektionen die T-Zell-Reaktion und die epidermale Proliferation eine besondere Rolle spielen (Odds 1994).

Der Nachweis für die Bedeutung der zellulären Immunität in der Abwehr von *Candida*-Infektionen wurde durch die Beobachtung von Patienten mit T-Zell-Defekten und niedrigen CD4-Zellzahlen, wie sie bei HIV-Infektionen vorkommen, erbracht. Diese Patienten erkranken gehäuft an chronischen cutanen und mucocutanen Candidosen (Sweet 1997).

Die Regeneration des Stratum corneum repräsentiert einen unspezifischen Abwehrmechanismus (Wagner und Sohnle 1995). Dadurch werden potentiell infektiöse Mikroorganismen, die auf der Haut leben, abgestoßen. Bei Entzündungen, einschließlich der zellvermittelten Immunreaktion, ist die epidermale Proliferation beschleunigt. Im Rahmen von Schädigungen der epidermalen Barriere kommt es gehäuft zu cutanen Manifestationen von *Candida*-Infektionen (Bodey 1993).

Keratinocyten als Hauptbestandteil der Epidermis sind in der Lage, *Candida-albicans*-Zellen zu phagozytieren (Vazques-Torres und Balis 1997, Csato et al. 1986).

Als Zellen der humoralen Abwehr sind vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten für die Immunität gegenüber *Candida albicans* verantwortlich (Rogers und Balish 1980).

Die Sekretion antimykotischer Substanzen ist ein weiterer Abwehrmechanismus des Wirtes. Sphingosine besitzen antimykotische Eigenschaften und werden als Talgbestandteil sezerniert (Bibel et al. 1993). Eine Reihe unspezifischer fungizider Proteine konnte von normaler Epidermis isoliert werden (Kashima et al. 1989). Die Sekretion von IgA-Antikörpern vermindert die Adhärenz von *Candida albicans* an der oralen Mukosa (Vazques-Torres und Balish 1995, Epstein et al. 1982).

Ein entscheidender Faktor der Wirtsabwehr ist die Besiedlung der Haut und Schleimhaut mit anderer mikrobieller Flora, die mit *Candida albicans* um die epitheliale Kolonisation konkurriert (Odds 1994). Eine Langzeitbehandlung mit Antibiotika stört die normalen Regulationsmechanismen dieses Ökosystems empfindlich (Ghannoum 1988).

### 1.1.5. Pathogenitätsfaktoren von *Candida albicans*

Die Pathogenität von *Candida albicans* wird durch das Zusammenwirken mehrerer Virulenzfaktoren determiniert (Tab. 1).

#### **Dimorphismus**

Unter Dimorphismus wird die Fähigkeit von *Candida albicans* verstanden, in Form von hefeartigen Blastokonidien (Synonym Blastosporen) und den hyphenartigen Myzelien zu wachsen (Ghannoum und Abu-Elteen 1990, Odds 1988). Die Keimschlauchbildung markiert den Beginn der Hyphenbildung; sie ist induzierbar durch Änderung der Umweltbedingungen, z.B. Erhöhung der Temperatur auf 37°C, Vorhandensein von Serum und Neutralisierung des pH-Wertes. Dieser Übergang von Hefe- zu Hyphenwachstum wird von den meisten Autoren als ein bedeutender Virulenzfaktor angesehen (Casanova et al. 1997, Cutler 1991). Die physiologischen Mechanismen und die molekulare Regulation dieses Prozesses sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Sweet 1997). Phänotypische Untersuchungen haben gezeigt, daß mehr als ein Signaltransduktionsweg die Hyphenbildung auslösen kann (Leberer et al. 1996, Köhler und Fink 1996).

Der größte Teil der Studien zur Hyphenbildung geht von einer verstärkten Pathogenität hyphenbildender (germinativer) Stämme aus, da diese über eine höhere Adhärenz und Penetrationsfähigkeit verfügen (Corner und Magee 1997, Leberer et al. 1997, Chaturvedi et al. 1994). Es konnte jedoch auch in einigen Arbeiten gezeigt werden, daß agerminative Stämme ebenfalls zu Infektionen führen können (Shepherd 1985, Sobel et al. 1984, Klotz et al. 1983). Wahrscheinlich ist das Zusammenspiel beider morphologischer Formen entscheidend für die Virulenz von *Candida albicans* (Ghannoum und Abu-Elteen 1990).

Bei der Invasion in Wirtsgewebe bewirken Keimschläuche und Hyphen am Ort der Penetration keine Verformung der Epithelfläche (Abb. 2). Die Art des Eindringens deutet vielmehr auf lytische Aktivitäten des Pilzes hin, die auf die nächste Umgebung der Pilzzelle beschränkt bleiben (Vatavarian 1992, Borg und Rüchel 1988). Als Mediatoren kommen Proteasen und die Sekretion organischer Säuren in Betracht (Shepherd 1985).

An diesem Prozeß könnten auch reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sein, da sie zytotoxische Eigenschaften besitzen (Danley et al. 1983).

## Adhärenz

Eine wichtige Voraussetzung für die Persistenz von *Candida albicans* auf Haut und Schleimhäuten ist die Adhärenz an Epithelzellen (Abb. 2). Unter experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, daß *Candida albicans* von allen *Candida*-Stämmen die höchste Adhärenzfähigkeit an Epithelzellen und andere Oberflächen besitzt (Calderone und Braun 1991). Zudem bindet *Candida albicans* am stärksten an Epithelzellen unter Bedingungen, die die Keimschlauchbildung verstärken (Sobel et al. 1981, Kimura und Pearsall 1980).

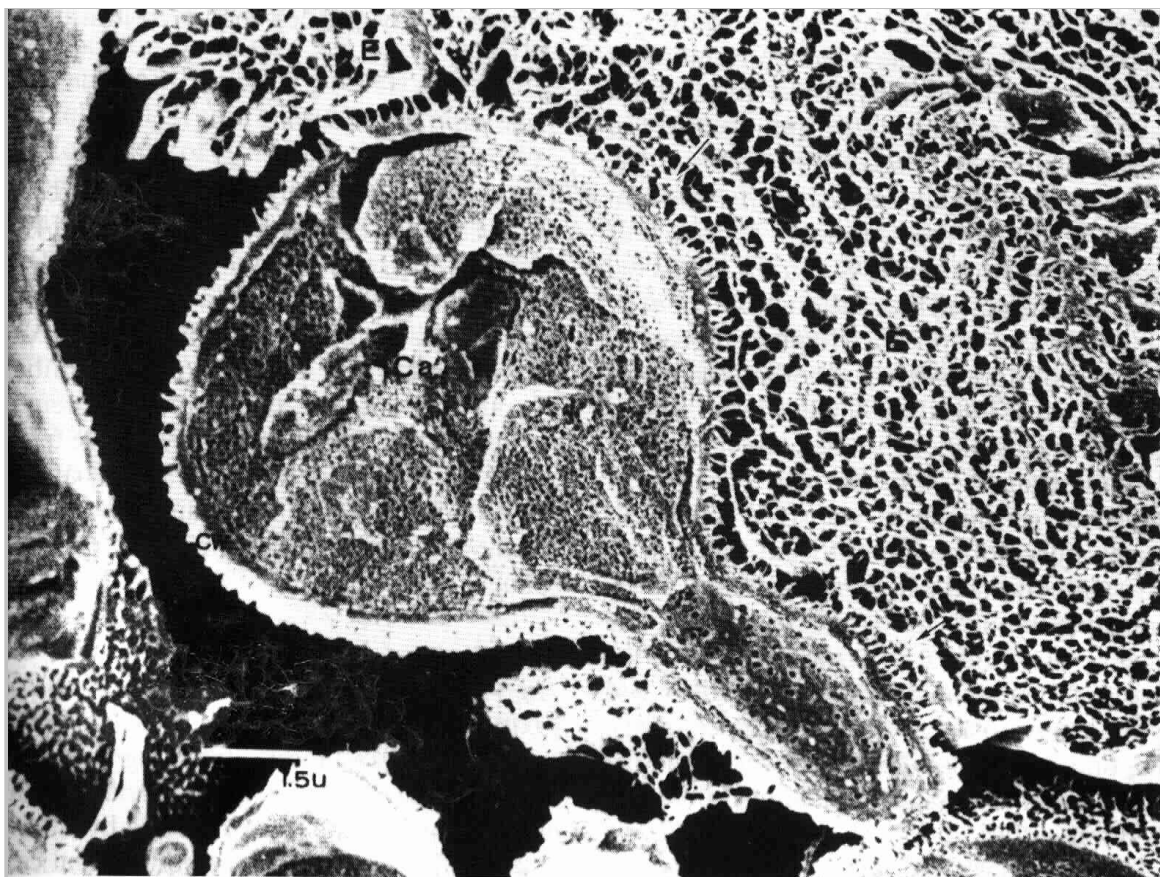


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Candida albicans* mit Keimschlauchbildung, an Epithelzellen haftend (nach Ghannoum et al. 1990).

Die Adhärenz erfolgt durch nicht-kovalente, bevorzugt hydrophobe Bindungen (Kennedy et al. 1992). Auf der Oberfläche von adhärenen *Candida-albicans*-Zellen wurde eine fibrilläre Kapselsubstanz lokalisiert, bei der es sich um ein Mannanprotein handelt, das adhäsive Funktionen besitzt (Vartivarian 1992). Bedeutsam für die Adhärenz ist offenbar auch die Bindung der extrazellulären Matrixproteine Fibrinogen, Kollagen, Laminin und

Fibronectin an Pilzelemente. Diesen Proteinen ist die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD-Sequenz) gemeinsam, für die *Candida albicans* integrinähnliche Rezeptoren besitzt (Klotz et al. 1992). Auch Oberflächenproteine, die als Rezeptoren für die Komplementfaktoren C3d und iC3b dienen, spielen bei der Adhärenz an Epithelzellen eine wichtige Rolle, wie Inhibitionsversuche mit spezifischen Antikörpern zeigen konnten (Frey et al. 1990, Ollert et al. 1990). Ein lectinähnlicher Rezeptor wurde beschrieben, der mit verschiedenen Zuckerbestandteilen der Epithelzell-Glykoproteine interagiert (Critchley und Douglas 1987). Die Adhärenz an Epithelzellen und Keratinozyten ist außerdem von extrazellulären Enzymen des Hefepilzes abhängig. Durch Inhibition der sekretorischen Carboxyl-Protease von *Candida albicans* konnte die Adhärenz an orale Schleimhaut weitgehend unterdrückt werden (El-Maghrabi et al. 1990, Borg und Rüchel 1988). Die Fähigkeit zur Koadhärenz, daß heißt das Haften von *Candida-albicans*-Zellen untereinander, scheint ebenfalls wichtig für die Kolonisation und Invasion von Wirtszellen zu sein (Ollert et al. 1993).

### **Thigmotropismus**

*Candida albicans* verfügt über die Fähigkeit, die interzellulären Verbindungen der Schleimhautoberflächen durch Berührung zu erkennen und diese gezielt zu penetrieren (Gow et al. 1994, Sherwood et al. 1992). Dieser Virulenzfaktor wird als Thigmotropismus oder auch "contact sensing" bezeichnet. *In-vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, daß der Thigmotropismus bei *Candida albicans* dann am stärksten ist, wenn Keimschläuche und Hyphen gebildet werden (Nikawa et al. 1997).

### **Proteasenbildung**

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *Candida albicans* ist die Fähigkeit, sekretorische Aspartatproteasen (secreted aspartyl proteases, SAP) zu bilden. Das Aktivitätsoptimum der SAP liegt bei einem pH-Wert von 3,2. Bei einem pH-Wert > 5 ist eine Aktivität nicht mehr nachweisbar (Sweet 1997). Diese sauren Proteasen spalten unspezifisch eine Vielzahl von Proteinen, wie z.B. Albumin, Keratin, Hämoglobin und Immunglobuline (Kamanishi et al. 1995, Kilian et al. 1988, Rüchel 1986). Die SAP-Aktivität wird durch eine gleichzeitige Säuresekretion begünstigt, die aus dem unvollständigen Abbau von Kohlenhydraten entstehen kann. Die glukoseabhängige

Induktion der SAP kann die erhöhte Soor-Anfälligkeit von Diabetikern erklären (Rüchel et al. 1992). Wie in vielen Untersuchungen gezeigt werden konnte, korreliert die SAP-Produktion meist mit der Pathogenität des *Candida-albicans*-Stammes (Okamoto et al. 1993, Douglas 1988, MacDonald und Odds 1983). Bisher wurden 9 verschiedene Gene für die SAP beschrieben (Sweet 1997, White und Agabian 1995). In einer *In-vivo*-Untersuchung bei oraler Candidose konnte die Expression aller 9 Proteasen nachgewiesen werden. Es traten deutliche Unterschiede in der Konzentration der Enzyme während der Kolonisation und Invasion auf (Naglik et al. 1999). SAP spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Immunantwort auf epithelialen Oberflächen (Beausejour et al. 1998).

Verschiedene extrazelluläre lipolytische Hydrolasen, wie Phospholipase A - C und eine Lysophospholipase, konnten bei *Candida albicans* nachgewiesen werden (Cutler et al. 1991, Takahashi et al. 1991). Untersuchungen bei hämatogenen *Candida-albicans*-Infektionen konnten eine pathogene Bedeutung von Phospholipase B und Lysophospholipase-Transacylase nachweisen (Ibrahim et al. 1995).

### **Polymorphismus**

Der Polymorphismus, auch als "phenotypic switching" bezeichnet, betrifft bei *Candida albicans* nur die Hefeform (Soll 1995 und 1992). Diese Veränderung des Phänotypes tritt relativ häufig bei jeder 100. bis 1000. Zellteilung auf und ist durch UV-Strahlung oder andere Streßfaktoren auslösbar. Die Koloniemorphologie ändert sich bei gleichbleibendem Genotyp ebenso wie die Eigenschaften Hydrophobizität, Adhärenz, Proteasensekretion sowie Empfindlichkeit gegenüber Granulozyten oder Antimykotika (White und Agabian 1995, Slutsky et al. 1985). Bei chronischer *Candida*-Vaginitis wurde mit jedem neuen Schub der Erkrankung ein Switching des infizierenden Stammes beobachtet (Sobel 1992). Switching könnte somit dazu dienen, die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu unterlaufen.

### **Synergismus mit Bakterien**

*Candida albicans* konkurriert mit anderen Mikroorganismen um die Kolonisation des Wirtes (Bodey 1993, Odds 1988). Es wurden synergistische und antagonistische Effekte beobachtet. So stören gramnegative Enterobakterien und Anaerobier die Besiedlung des

Wirtes mit *Candida albicans* (Rüchel et al. 1991). Dagegen steht *Candida albicans* mit *Staphylococcus aureus* und Enterokokken in einem synergistischen Verhältnis, wie tierexperimentelle Untersuchungen zeigen konnten (Carlson und Johnson 1985).

### **Schutz vor Phagozytose**

*Candida albicans* ist in der Lage, die Abwehrmechanismen des Wirtes zu stören. So wirken Mannanproteine und Oligosaccharide aus der *Candida*-Zellwand inhibitorisch auf das zelluläre Immunsystem (Garner et al. 1990, Podzorski et al. 1990).

Es wurden Faktoren von *Candida albicans* beschrieben, die die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, den sogenannten "respiratory burst", hemmen können (Smail et al. 1992). Dabei spielen wahrscheinlich sekretorische Aspartatproteasen eine entscheidende Rolle (Borg-von-Zepelin und Schuff-Werner 1992). Aber auch Interaktionen mit ROS, die von *Candida albicans* gebildet werden, könnten einen großen Einfluß haben (Danley et al. 1983).

Nach der Phagozytose durch humane Phagozyten können Blastosporen von *Candida albicans* diese durch zytotoxische Effekte lysieren. Blastosporen besitzen die Fähigkeit, in polymorphkernigen Leukozyten zu überleben, Keimschläuche zu bilden und durch die Wirtszellmembranen nach außen zu penetrieren (Danley und Polakoff 1986).

## 1.2. *Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)*

### 1.2.1. Allgemeine Aspekte

Unter dem Begriff der reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) werden solche Formen des molekularen und radikalischen Sauerstoffes zusammengefaßt, die als hochreaktive Stoffwechselprodukte zur Schädigung von Zellen und Zellverbänden führen können. Sie reagieren mit Fettsäuren in Zellmembranen, Nukleotiden der DNA, Schwefelwasserstoff-Bindungen von Proteinen und können sich schädigend auf Struktur und Funktion auswirken (Toyokuni 1999).

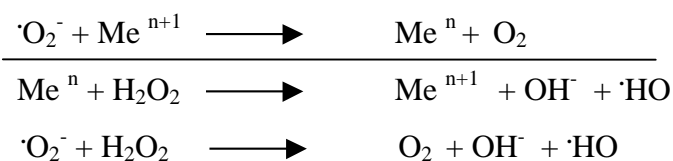
ROS entstehen bei einer Vielzahl von sauerstoffabhängigen Prozessen als Superoxidanionenradikal ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), Hydroxylradikal ( $\cdot\text{HO}$ ) und als Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Slater 1984).

Die Entstehung von  $\cdot\text{HO}$  wird durch folgende Reaktionen beschrieben: In der klassischen Haber-Weiss-Reaktion wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkt durch  $\cdot\text{O}_2^-$  reduziert (Khan und Kasha 1994, Diguseppi und Fridovich, 1980). Diese Reaktion verläuft unter physiologischen Bedingungen sehr langsam. Die Fenton-Reaktion, 1876 erstmals beschrieben, wird durch ein oxidiertes Metall (z.B. Eisen) katalysiert; die Reaktionsprodukte bleiben gleich (Wardman und Candeias 1996, Fantone et al. 1982).

Klassische Haber-Weiss-Reaktion:



Modifizierte Haber-Weiss-Reaktion (Fenton-Reaktion):



Endogene Quellen von ROS sind das endoplasmatische Retikulum mit dem Cytochrom P450, die Atmungskette von Mitochondrien, Peroxisomen und bei Phagozyten vor allem die plasmamembranassoziierte NADPH-Oxidase (Machlin et al. 1987, Brunori et al. 1984).

Im Rahmen inflammatorischer Reaktionen zeigen Phagozyten nach Stimulation mit unterschiedlichen Aktivatoren (z.B. Faktoren des Komplementsystems) einen sogenannten „respiratory burst“, der eine gesteigerte O<sub>2</sub>-Aufnahme und Produktion von ROS darstellt. Dabei werden in einer Elektronentransportkette reduzierte Sauerstoffspezies in Plasmamembranen gebildet und sezerniert, um Mikroorganismen zu schädigen (Owen et al. 1994, Fantone et al. 1982). Bei fehlendem oder abgeschwächtem „respiratory burst“ im Rahmen der chronischen Granulomatose kann es durch unzureichende Immunabwehr zur erhöhten Infektanfälligkeit kommen (Fridovich 1984).

Die Balance zwischen Produktion und Katabolismus von Oxidantien ist entscheidend für die biologische Integrität zellulärer Elemente. Eine wesentliche Eigenschaft aller Zellen sind protektive Mechanismen gegenüber ROS-induzierten Schädigungen, die sowohl durch endogen als auch exogen gebildete Oxidantien bedingt sein können. Die wichtigsten daran beteiligten Enzymsysteme sind:

1. Superoxiddismutase (SOD), die 1968 erstmals beschrieben und in allen aeroben Organismen nachgewiesen wurde, katalysiert die Reaktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die SOD spielt eine entscheidende Rolle bei dem Schutz eukaryotischer Systeme. Es sind mehrere Formen beschrieben worden, darunter eine manganabhängige SOD in Mitochondrien und prokaryotischen Zellen und eine kupfer/zinkhaltige SOD im Zytosol von eukaryotischen Zellen (McCord und Fridovich 1988 und 1968).
2. Zur Entgiftung des beim „respiratory burst“ und nach Reaktion mit SOD anfallenden Wasserstoffperoxid wurde das Enzym Catalase identifiziert; es katalysiert die Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O im Zytosol und in Peroxisomen (Machlin et al. 1987).
3. Glutathion-Peroxidase, ein selenabhängiges Enzym, das in hohen Konzentrationen im Zytosol vorhanden ist, entgiftet ebenfalls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O durch Oxidation des reduzierten Glutathions und spielt eine bedeutende Rolle beim Schutz vor der Lipidperoxidation (Fantone et al. 1982).



Für Bakterien konnte gezeigt werden, daß beispielsweise *Streptococcus faecalis* aus 17 % des insgesamt aufgenommenen Sauerstoffes reaktive Sauerstoffspezies bildet (Fridovich 1984). Bei Hefepilzen hingegen gibt es wenige Studien zur Produktion extrazellulär freigesetzter ROS. Danley et al. untersuchten den oxidativen Metabolismus von Neutrophilen und *Candida albicans* und konnten sowohl qualitative als auch quantitative Ähnlichkeiten bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies aufzeigen (Danley et al. 1983).

### 1.2.2. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von *Candida albicans*

Bei Hefen werden extrazellulär freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies in den Mitochondrien gebildet (Danley et al. 1983, Boveris 1978, Borgers et al. 1977).

Die Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Superoxidanionen ( $\cdot O_2^-$ ) wurde in Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (Boveris 1978).

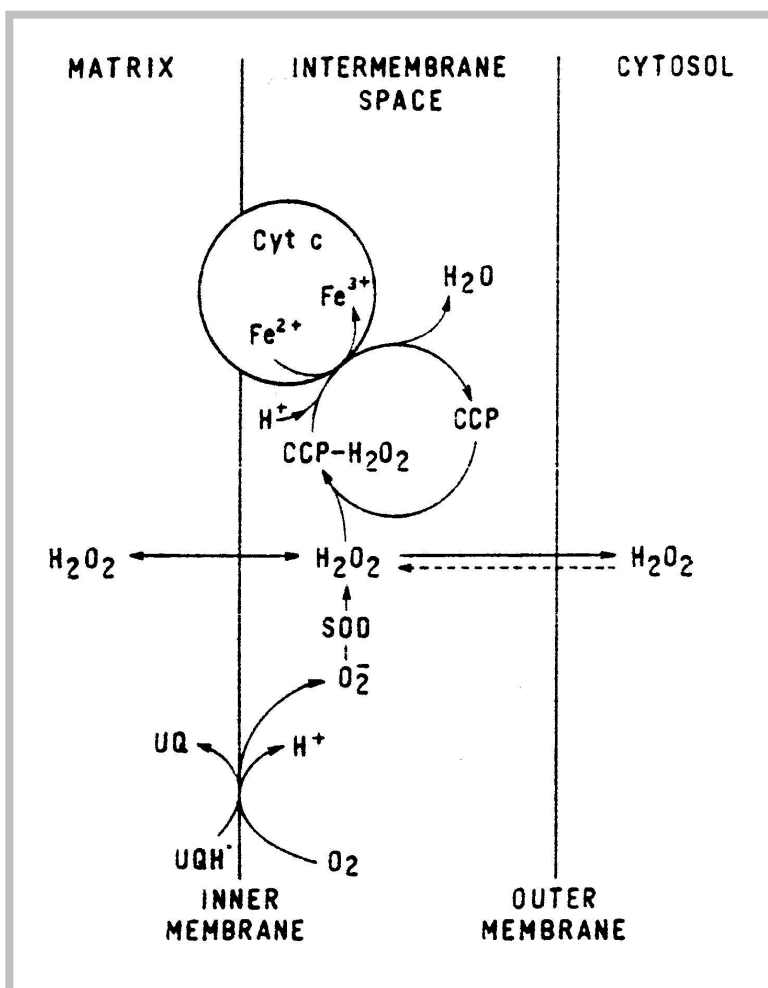


Abb. 3:  
Bildung von  $H_2O_2$  und  $\cdot O_2^-$   
in Mitochondrien von  
Hefen.  
Darstellung der Funktion  
von Superoxiddismutase  
(SOD) und Cytochrom-c-  
Peroxidase (CCP).  
Ubisemiquinon (UQ) und  
Cytochrom c (Cyt c) sind  
Enzyme der Atmungskette.  
Nach Boveris 1978.

Ubisemiquinon, ein Enzym der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran, bildet aus molekularem Sauerstoff Superoxidanionen. Durch eine mitochondriale Superoxiddismutase (SOD) im Intermembranspalt werden diese zu Wasserstoffperoxid dismutiert. Unter physiologischen Bedingungen werden etwa 50 % des  $H_2O_2$  durch eine Cytochrom-c-Peroxidase abgebaut, die ebenfalls im Intermembranspalt lokalisiert ist (De Nollin et al. 1975, Yamaguchi et al. 1971). Dadurch wird die Diffusion von  $H_2O_2$  in das Zytosol erschwert. Die äußere Mitochondrienmembran ist für  $H_2O_2$  durchlässig (Abb. 3). Es konnte außerdem eine NADH-Oxidase-Aktivität, die Wasserstoffperoxid aus NADH und  $O_2$  bildet, an den Mitochondrienristae von *Candida albicans* nachgewiesen werden (Borgers et al. 1977).

Danley et al. konnten zeigen, daß auch von *Candida albicans* extrazellulär freigesetzte ROS in den Mitochondrien gebildet werden. Sie verwendeten Antimycin A und Rotenon-Verbindungen, die die mitochondriale Atmungskette blockieren, und stellten einen Rückgang der extrazellulär meßbaren ROS-Bildung fest (Danley et al. 1983). Da die Mitochondrien nahe an der Zellmembran lokalisiert sind, wird das Risiko für die Hefe durch die potentiell zytotoxischen ROS minimiert (siehe Abb. 1).

Verschiedene protektive Enzyme, die vor oxidativen Schädigungen schützen, konnten im Zytosol von *Candida albicans* identifiziert werden (Romandini et al. 1994, Tosado-Acevedo et al. 1992). Catalase ist ein antioxidatives Enzym, das aerobe Organismen vor den toxischen Effekten von Wasserstoffperoxid schützt. Ein Catalase-Gen von *Candida albicans* konnte isoliert und sequenziert werden. Eine Depletion dieses Gens resultierte in einer höheren Sensitivität gegenüber Schädigungen durch neutrophile Granulozyten und exogenes Wasserstoffperoxid. In einem Infektionsmodell für die systemische Candidose wurde für den homozygoten Nullmutantenstamm eine verminderte Virulenz nachgewiesen (Wysong et al. 1998).

Superoxiddismutase spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz der Zellen vor oxidativen Schädigungen durch Sauerstoffradikale. Das isolierte Enzym wurde als Kupfer/Zink-Superoxiddismutase identifiziert (Gunasekaran et al. 1998). Die höchste SOD-Aktivität wurde in der Zytosolfraction nachgewiesen, während der extrazelluläre SOD-Spiegel sehr niedrig war. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß dieses Enzym dazu dient, das oxidative Gleichgewicht und die biologische Integrität innerhalb der Zelle zu erhalten.

### 1.3. Nachweismethoden

#### 1.3.1. Chemilumineszenz

Das Prinzip der Chemilumineszenzmessung beruht auf der Registrierung von Lichtimpulsen, die während chemischer Prozesse bei der Umwandlung von chemischer Energie in Lichtenergie entstehen (Albrecht et al. 1997). Die Messung der Chemilumineszenz ist hoch spezifisch und sensitiv; sie gibt die Möglichkeit zur gleichzeitigen Untersuchung verschiedener Arten reaktiver Sauerstoffspezies (Klinger et al. 1996, Storch und Ferber 1988, Minkenberg und Ferber 1984).

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies geht mit der proportionalen Produktion von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) einher. Das von  $^1\text{O}_2$  emittierte Licht mit den Wellenlängen 634, 669 und 703 nm wird auch als native Chemilumineszenz bezeichnet (Albrecht et al. 1997). Aufgrund der sehr schwachen nativen Lumineszenzphänomene bedient man sich der lucigenin- oder luminolverstärkten Chemilumineszenz für den Nachweis von Sauerstoffradikalen in biologischen Systemen (Klinger et al. 1996, McKinney et al. 1996, Minkenberg und Ferber 1984).

Die Wellenlänge des bei der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz entstehenden Lichtes beträgt 530 nm (Albrecht et al. 1997). Lucigenin ist ein wasserlösliches Acridiniumsalz, das mit Sauerstoffmetaboliten reagieren und ein elektronisch angeregtes Methylacridon bilden kann, das nach Photonenemission wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt (Peters et al. 1990).

Welche Radikale des Sauerstoffes bei der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz tatsächlich nachgewiesen werden, wird sehr kontrovers diskutiert. Am häufigsten wird der extrazelluläre Nachweis von Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ) beschrieben. Dieses Radikal wird durch Einsatz von Superoxiddismutase (SOD) bis zu 95 % inhibiert (McKinney et al. 1996, Storch und Ferber 1988, Minkenberg und Ferber 1984, Williams und Cole 1981). Einige Autoren gehen auch von einer intrazellulären Detektion der Superoxidanionenradikale aus, da keine Inhibierung durch extrazellulär zugegebene SOD oder Catalase nachzuweisen ist (Galutzov und Ganeva 1997, Peters et al. 1990).

Klinger et al. konnten bei Versuchen an Lebermikrosomen mit dieser Methode die mikrosomale Hydroxylradikalbildung ( $\cdot\text{HO}$ ) nachweisen. Die Zugabe von SOD und Catalase blieb ohne Einfluß (Klinger et al. 1996).

Liochev und Fridovich diskutierten die mögliche Mediatorenfunktion von Lucigenin als Radikalbildner (Liochev und Fridovich 1997). Diese These konnte widerlegt werden; die lucigeninverstärkte Chemilumineszenz wird als die Methode mit der größten Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Superoxidanionen in biologischen Systemen betrachtet (Afanasev et al. 1999).

### 1.3.2. Reduktion von Cytochrom c

Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse zum Nachweis der ROS-Bildung mittels lucigeninverstärkter Chemilumineszenz haben einige Autoren die Reduktion von Cytochrom c als vergleichenden Assay hinzugezogen (Deliconstantinos et al. 1997, Storch und Ferber 1987, Minkenberg und Ferber 1984). Diese Methode wurde bereits zum Nachweis der ROS-Bildung bei *Candida albicans* verwendet (Danley et al. 1983).

Cytochrom c wird für den Nachweis von Superoxidanionenradikalen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) *in vitro* und *in vivo* verwendet (Inoue und Koyama 1994, Minkenberg und Ferber 1984, Williams und Cole 1981). Da Cytochrom c nicht nur mit  $\cdot\text{O}_2^-$ , sondern auch mit anderen reduzierenden Verbindungen, sowie Cytochrom-c-Reduktasen und -Oxidasen reagieren kann, wird azetyliertes Cytochrom c für die Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$  in komplexen biologischen Systemen verwendet (Azzi et al. 1975).

Die Reduktion von azetyliertem Cytochrom c ist spezifisch für den Nachweis von Superoxidanionen. Allerdings ist die Sensitivität deutlich geringer als bei der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz (Storch und Ferber 1987).

Azetyliertes Cytochrom c wird in der Anwesenheit von Superoxidanionen reduziert. Die Absorption bei 550 nm nimmt dabei zu. Die Bildung von Superoxidanionen wird als Reduktion von azetyliertem Cytochrom c in der An- und Abwesenheit von Superoxiddismutase gemessen (Deliconstantinos et al. 1997, Danley et al. 1983, Curnutte et al. 1975).

#### 1.4. Terbinafin als Antimykotikum und Radikalfänger

Terbinafin, ein Antimykotikum der Allylamin-Klasse, hat vorrangig eine fungizide Wirkung auf Pilze durch Hemmung der Squalenepoxidase (Abb. 4). Behandelte Pilze akkumulieren Squalen, wobei ein Mangel an Ergosterol, einer essentiellen Komponente der Zellmembran, entsteht (Georgopapdakou und Bertasso 1992, Ryder 1992). Bei *Candida albicans* ist die Wachstumshemmung durch Terbinafin wahrscheinlich das Ergebnis des Ergosterolmangels, wobei die Hyphenform empfindlicher als die Blastosporenform reagiert (Ryder und Favre 1997). Die Hemmung der Squalenepoxidase ist hoch spezifisch für das von *Candida albicans* exprimierte Enzym (Ryder 1997).

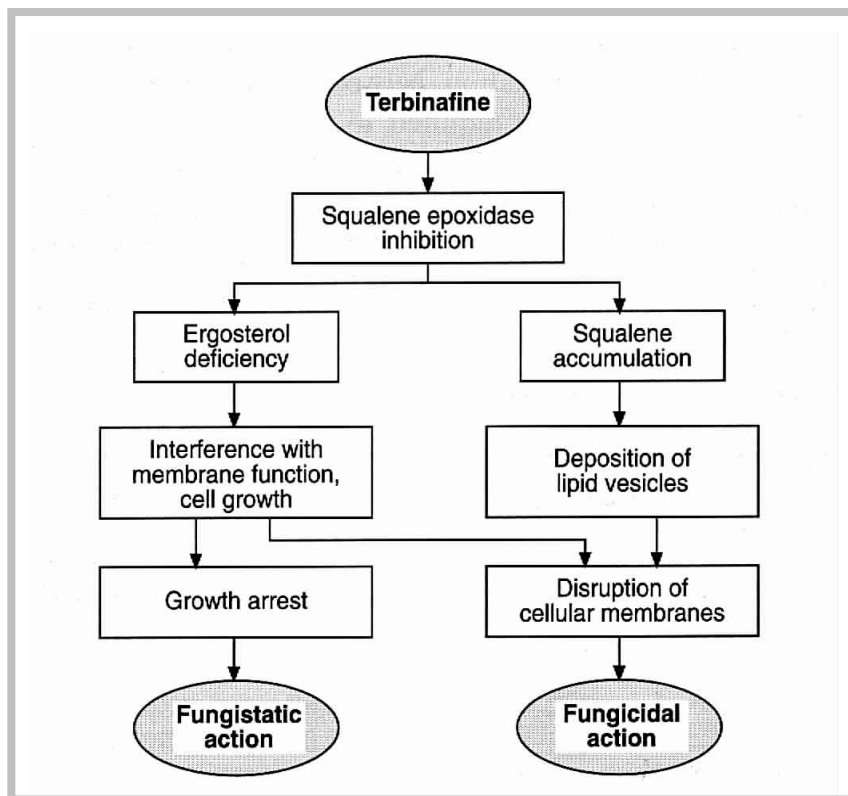


Abb. 4:  
Mechanismus der fungiziden und fungistatischen Wirkung von Terbinafin.  
Nach Ryder 1992.

Für Terbinafin wurde weiterhin eine Modifikation der Funktion von neutrophilen Granulozyten beschrieben. Mit Chemilumineszenzmessungen war eine Reduktion der ROS-Bildung durch Terbinafin und eine antiinflammatorische Wirkung nachzuweisen (Vago et al. 1994). Die Bildung von freien Sauerstoffradikalen kann *in vitro* durch Terbinafin in therapeutischen Konzentrationen inhibiert werden (Camera et al. 1999).

### 1.5. Aufgabenstellung und Ziel

*Candida albicans* ist der wichtigste Erreger von opportunistischen Pilzinfektionen. Unter den bekannten Virulenzfaktoren kommt dem Dimorphismus eine entscheidende Bedeutung zu. Hyphen besitzen gegenüber der Hefeform Vorteile bei der Gewebsinvasion. Die Art des Eindringens in Gewebe deutet auf lytische Aktivitäten der Hyphen hin, die auf die nächste Umgebung beschränkt sind. Reaktive Sauerstoffspezies haben zytotoxische Eigenschaften. Sie könnten eine wichtige Funktion bei der Infektion, Gewebsinvasion und Modulation der Wirtsabwehr besitzen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Fähigkeit von *Candida albicans* untersucht werden, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden. Dabei sollte vor allem der Einfluß der verschiedenen morphologischen Formen berücksichtigt werden, da diesen bei der Pathophysiologie von *Candida-albicans*-Infektionen eine besondere Bedeutung zukommt.

Anhand der Untersuchungen mit dem *Candida-albicans*-Stamm 3153A sollte überprüft werden, ob eine Konzentrationsabhängigkeit der ROS-Bildung in der Blastosporenphase vorliegt und ob verschiedene Kulturmedien Einflüsse auf das Meßergebnis haben. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Chemilumineszenzmessung eine geeignete Methode zur Detektion von extrazellulär liberierten ROS bei *Candida albicans* ist. Im morphologischen Vergleich von Blastosporen, Zellen mit Keimschlauchbildung und Hyphen sollten mögliche quantitative Unterschiede in der Bildung von ROS aufgezeigt werden.

Der Einfluß von antimykotischen Substanzen auf die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sollte anhand des modernen Antimykotikums Terbinafin untersucht werden. Dieses hemmt spezifisch die Ergosterolbiosynthese und besitzt zusätzlich antiinflammatorische Eigenschaften.

Um den Zusammenhang zwischen Hyphenbildung, Pathogenität und ROS-Bildung stärker zu verdeutlichen, sollte anhand des virulenten hyphenbildenden Stammes CA6 und seiner avirulenten agerminativen Mutante VIR3 der Einfluß der Hyphenbildung und Pathogenität auf die ROS-Bildung dargestellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Albumin Standard (Konzentration 2 mg/ml) aus BSA             | Fa. Pierce, Rockford           |
| BCA-Protein Assay Reagenzien (Reagenz A und B)               | Fa. Pierce, Rockford           |
| Casyton-Lösung (Isotonische Salzlösung)                      | Fa. Schärfe-System, Reutlingen |
| Casyclean-Lösung (Reinigungslösung)                          | Fa. Schärfe-System, Reutlingen |
| Cytochrom c, teilweise azetyliert, aus Pferdeherz            | Fa. Sigma, St. Louis           |
| <sup>14</sup> D- Glukose (Endotoxin getestet)                | Fa. Sigma, St. Louis           |
| DMSO (zur Synthese, Fraktion V)                              | Fa. Merck, Hohenbrunn          |
| Fetales Kälberserum (Mycoplasmen getestet)                   | Fa. Gibco, Eggenstein          |
| Krebs-Ringer-Phosphat-Glukose-Puffer, pH = 7,4               | Fa. Sigma, St. Louis           |
| Lucigenin (N, N'-Dimethyl-9,9'-Biacridinium-Dinitrat)        | Fa. Fluka, Buchs               |
| PBS-Tabletten (1 Tbl. für 200 ml H <sub>2</sub> O, pH = 7,4) | Fa. Sigma, St. Louis           |
| Peptisches Pepton aus Blut                                   | Fa. Berlin-Chemie, Berlin      |
| Physiologische NaCl-Lösung (0,9 %)                           | Fa. Braun, Melsungen           |
| Sabouraud-Glukose (4 %)-Agar                                 | Fa. BAG, Lich                  |
| Superoxiddismutase 75 000 U, aus bovinen Erythrozyten        | Fa. Sigma, St. Louis           |
| Terbinafinhydrochlorid                                       | Fa. Novartis, Basel            |
| Yeast Extract  | Fa. Difco, Detroit             |

## 2.2. *Candida albicans*

### 2.2.1. Stämme und Kulturbedingungen

Die *Candida-albicans*-Stämme 3153A, CA6 und VIR3<sup>1</sup> fanden für Untersuchungen in dieser Arbeit Verwendung (Tab. 2).

Der Stamm *Candida albicans* 3153A aus dem Mykologischen Referenzlabor London wird häufig unter *In-vitro*-Bedingungen untersucht.

CA6 ist ein Wildstamm, dessen agerminative und avirulente Mutante VIR3 durch chemische Mutagenisierung entstanden ist.

| Stamm                         | Hyphenbildung     | Pathogenität | Literaturangaben  |
|-------------------------------|-------------------|--------------|---|
| <i>Candida albicans</i> 3153A | induzierbar       | hoch         | Mackenzie et al. 1991<br>Swoboda et al. 1995<br>Radford et al. 1998 |
| <i>Candida albicans</i> CA6   | induzierbar       | hoch         | Mazzolla et al. 1996 und 1991<br>Romani et al. 1994                 |
| <i>Candida albicans</i> VIR3  | nicht induzierbar | gering       | Romani 1991   |

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Stämme.

Alle Stämme wurden auf Sabouraud-Glukose(4 %)-Agar bei 28 °C kultiviert. Für die weiteren Untersuchungen wurden Einzelkolonien mit einem Durchmesser < 0,5 cm der 24 h - 48 h alten Subkulturen verwendet (Abb. 5).

Für die Untersuchungen in Flüssignährboden wurde Yeast-Extract-Peptide-Glucose-Medium (YEPG) aus

10 g Hefeextrakt,

10 g Glukose und

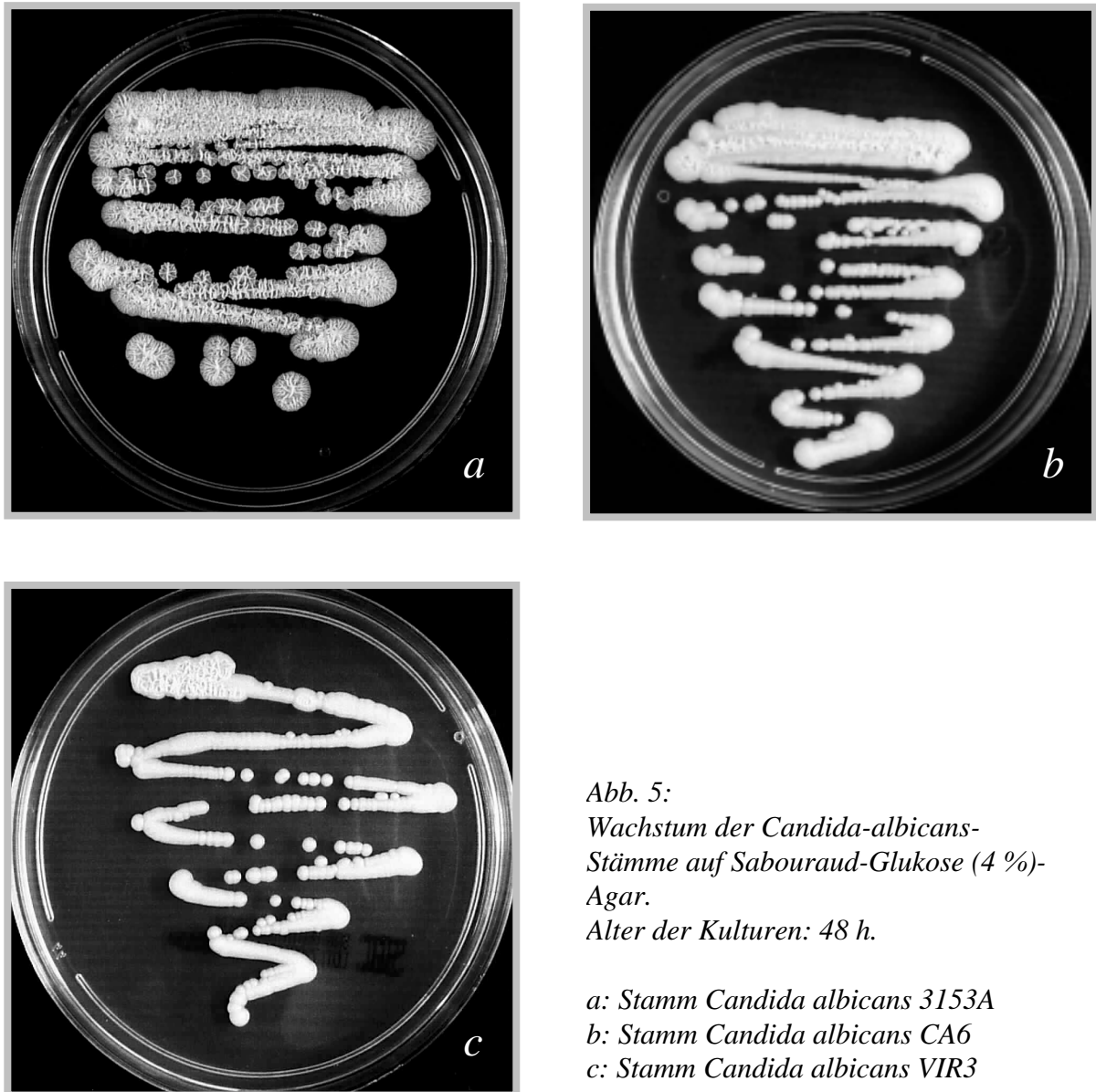
20 g Pepton

je Liter destilliertes Wasser hergestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

<sup>1</sup> Die bei diesen Untersuchungen verwendeten Stämme wurden von Herrn Professor Dr. Künkel vom Hans-Knöll-Institut Jena zur Verfügung gestellt.



Je 1 - 2 Einzelkolonien vom Festnährboden wurden in 50 ml YEPG-Medium inokuliert und bei 25 °C in Schüttelkultur 24 h inkubiert. Das Wachstum und die Konzentration dieser Vorkulturen wurden mit Hilfe der Zellzahl- und Proteinbestimmung untersucht (siehe 2.3. und 2.4.).



## 2.2.2. Hypheninduktion

Die Untersuchungen der *Candida-albicans*-Stämme 3153A, CA6 und VIR3 erfolgten unter hypheninduzierenden Bedingungen.

Zur Induktion der Hyphenbildung wurden zwei Parameter der Kulturbedingungen geändert: Zugabe von 10 % Serum (FKS) und Temperaturerhöhung auf 37 °C. Diese Bedingungen werden vor allem verwendet, wenn die pathogenetische Relevanz der Hyphenbildung für den menschlichen Organismus von Interesse ist (Swoboda et al. 1995). Um das Hyphenwachstum zu induzieren, wurden in das jeweilige Medium  $5 \times 10^6$  Zellen aus der 24 h alten Vorkultur inokuliert. Die Ansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lang inkubiert (Tab. 3).

| <b>Probe</b>         | <b>Medium</b>          | <b>Temperatur</b> | <b>Dauer</b> | <b>Morphologie</b>       |
|----------------------|------------------------|-------------------|--------------|--------------------------|
| Blastosporen         | 50 ml YEPG             | 25 °C             | 60 min       | Blastosporen             |
| Kontrolle/Temperatur | 50 ml YEPG             | 37 °C             | 60 min       | Blastosporen             |
| Kontrolle/Serum      | 45 ml YEPG<br>5 ml FKS | 25 °C             | 60 min       | Blastosporen             |
| Keimschlauchbildung  | 45 ml YEPG<br>5 ml FKS | 37 °C             | 30 min       | Keimschlauch-<br>bildung |
| Hyphenbildung        | 45 ml YEPG<br>5 ml FKS | 37 °C             | 60 min       | Hyphenbildung            |

Tab. 3: Übersicht über die verschiedenen Kulturansätze bei den Untersuchungen zur Hypheninduktion.

Bei den Stämmen 3153A und CA6 erfolgte unter diesen Bedingungen die Hypheninduktion, der Stamm VIR3 zeigte bei allen Ansätzen keine morphologischen Veränderungen.

Die Hyphenbildung wurden bei jedem Versuch mikroskopisch beobachtet und die relativen Anteile der verschiedenen morphologischen Formen dokumentiert, indem 100 Zellen ausgezählt und Blastosporen, Zellen mit Keimschläuchen oder Hyphen zugeordnet wurden.

### 2.3. Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven

Hefezellen aller *Candida-albicans*-Stämme aus den Flüssigkulturen dienten der Zellzahlbestimmung. Dazu wurden für jede zu bestimmende Zellsuspension Verdünnungen in Casyton-Lösung hergestellt (1:500 oder 1:1000). Die Zellzahlmessung erfolgte mit Hilfe des Casy Cellcounter (Schärfe-System, Reutlingen).

Der Bereich für die zu zählenden Zelldurchmesser wurde mit 2,25  $\mu\text{m}$  als untere Grenze und mit 9,75  $\mu\text{m}$  als obere Grenze festgelegt. Zur Messung wurde eine Kapillare mit dem Durchmesser 60  $\mu\text{m}$  verwendet (Abb. 6).

Das Kulturmedium der Hefen hatte keinen Einfluß auf die Meßgenauigkeit, da alle Medien vor der Verwendung steril filtriert wurden (Durchmesser des Filters 0,2  $\mu\text{m}$ ).

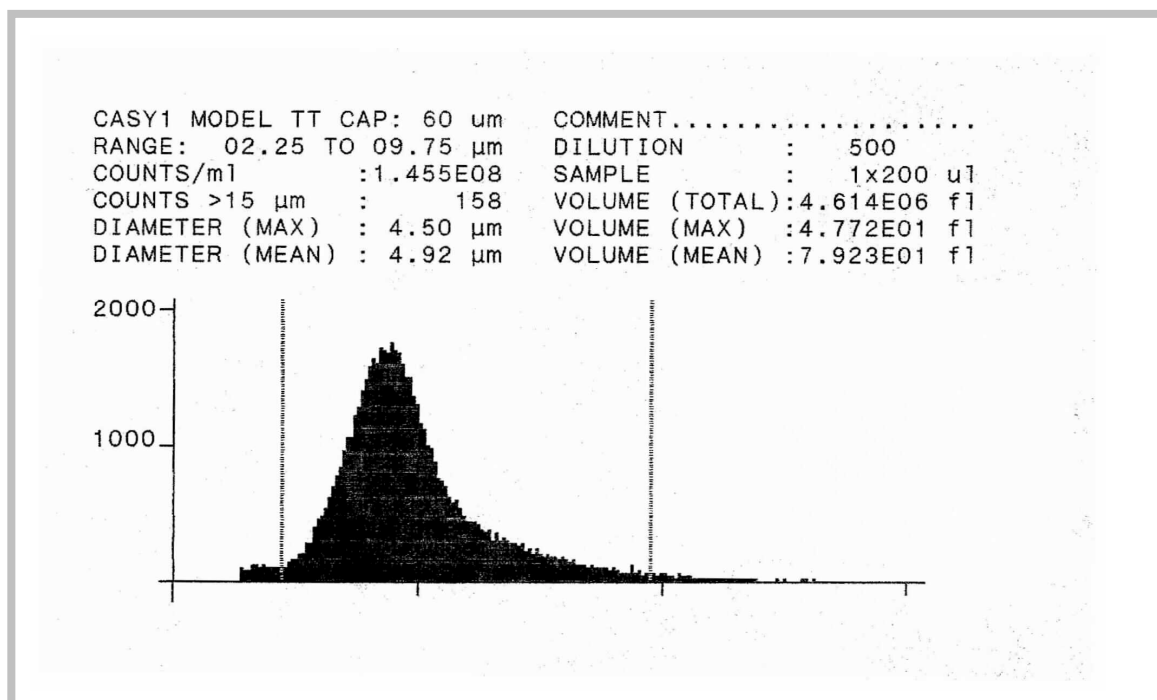


Abb. 6: Zellzahlmessung mit dem Casy-Cellcounter. Ausdruck für 24-h-Kultur, Stamm *Candida albicans* 3153A.

X-Achse: Zellgröße in  $\mu\text{m}$ , Y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen.

Die für den Stamm 3153A erstellten Wachstumskurven dienten der Zuordnung der Wachstumsphasen. Es wurden Kulturen in YEPG-Flüssigmedium über einen Zeitraum von 24 h beobachtet und zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h Zellzahlbestimmungen durchgeführt.

In Abb. 7 werden die verschiedenen Wachstumsphasen in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt.

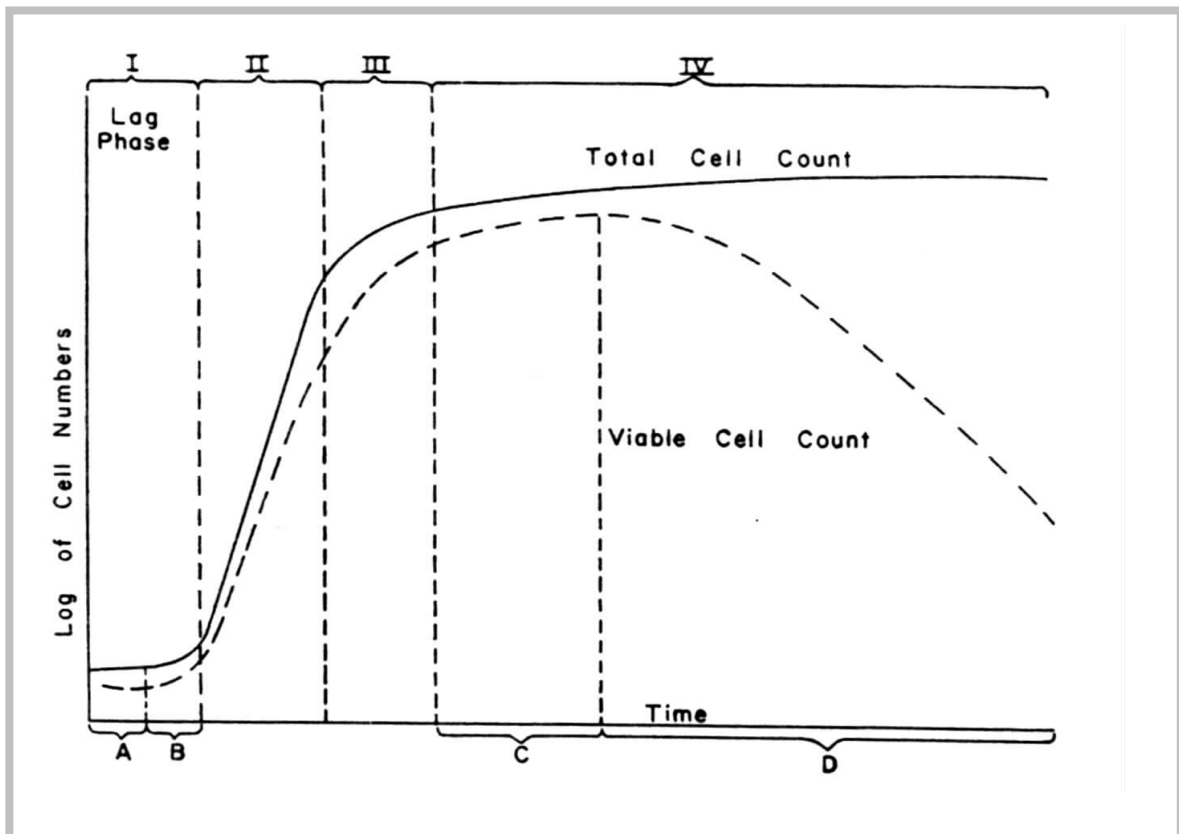


Abb. 7: Wachstumskurve von Hefen mit den verschiedenen Phasen des Wachstums und dem Unterschied zwischen der totalen Zellzahl und der Anzahl der lebenden Zellen. Nach Cook 1958.

- I:** Lag Phase
- II:** Exponentielle Wachstumsphase
- III:** Periode der negativen Akzeleration
- IV:** Stationäre Phase
- A:** Periode der Adaptation
- B:** Periode der Erholung
- C:** Echte Stationäre Phase
- D:** Phase der Abnahme

#### 2.4. Proteinbestimmung

Untersuchungen zum Proteingehalt von *Candida albicans* erfolgten bei verschiedenen Konzentrationen von Blastosporen sowie Zellen mit Keimschläuchen und Hyphen.

Für die Proteinbestimmungen wurden 50 ml der Hefekultur 5 min bei 500 x g zentrifugiert, 2 x mit 10 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und Suspensionen in 10 ml NaCl-Lösung hergestellt. Diese wurden mit einem Zellaufschlußgerät (Bead-Beater, Biospec Products, Bartlesville) zur Proteinbestimmung vorbereitet. Dafür wurden jeweils 10 ml der Hefezellsuspensionen mit 5 g Glasperlen (Fa. Roth, Karlsruhe; Durchmesser 0,25 mm - 0,5 mm) in den Aufschlußbehälter gebracht und unter Kühlung mit Eis 3 x je 1 min zerkleinert. Die Suspensionen wurden aufgenommen und 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Analyse der Überstände erfolgte mittels der Proteinbestimmungsmethode BCA (Fa. Pierce, Rockford) unter Verwendung des Standardprotokolls.

Die BCA-Methode weist Protein mit Hilfe der Biuret-Reaktion nach. Sie ist sehr empfindlich mit einer unteren Nachweisgrenze von 0,5 µg/ml Protein und resistent gegenüber Lösungsmitteln (Wiechelmann 1988, Smith 1985). Protein bildet mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden.

Für eine Doppelbestimmung wurden

- je 2 x 100 µl der Probe
- mit 2 ml des Reagenzmix aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B versetzt und
- 30 min bei 37 °C inkubiert.

Bei 562 nm wurde die Extinktion mit dem Spectrophotometer V530 (Fa. Jasco, Groß-Umstedt) gemessen. Eine für jede Untersuchung neu hergestellte Eichkurve mit bekannten Konzentrationen eines Albuminstandards aus bovinem Serumalbumin (Ausgangskonzentration 2 mg/ml) diente der Berechnung der Proteinkonzentration.

### 2.5. Chemilumineszenzmessungen

Der Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte bei allen drei *Candida-albicans*-Stämmen mittels lucigeninverstärkter Chemilumineszenz.

Für die Untersuchungen wurden Proben mit *Candida-albicans*-Zellen in verschiedenen Konzentrationen, Medien und morphologischen Formen vorbereitet. Die Messungen wurden im Röhrenluminometer LB 953 (Fa. Berthold, Wildbad) durchgeführt. Das LB 953 besitzt einen Standard-Dektor, der emittiertes Licht in einem Spektralbereich von 390 bis 620 nm messen kann. Für diese Messungen wurde eine Probenkette für 42 Röhren installiert. Bei einer Meßdauer von 0,1 s je Probe erhält man alle 1,9 min einen Meßpunkt jeder Probe. Diese Meßanordnung ermöglicht die gleichzeitige Messung von vielen Proben, wobei die "slow kinetic" Methode zu benutzen ist (Hipler et al. 1999 und 1998).

Die Einstellung der Temperatur in der Meßkammer erfolgte auf 37 °C. Für jede Probe wurden 200 µl der Pilzzellsuspensionen in Probenröhren (Durchmesser 12 mm) pipettiert. Eine Injektionspumpe diente der automatischen Zugabe von 200 µl einer 0,1 mmol/l Lucigeninlösung (N,N'-Dimethyl-9,9'-Biacridinium-Dinitrat) vor Beginn der Messung. Die Lucigeninlösung wurde in steril filtriertem PBS hergestellt (Filterporendurchmesser 0,2 µm) und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte, indem der Mittelwert aller cpm-Werte einer Probe während der Meßdauer von 20 min errechnet wurde. Von diesen Werten wurde der Background-Wert (entsprechendes Medium plus Lucigeninzugabe) subtrahiert.

### 2.6. Reduktion von Cytochrom c

Messungen mit dieser Methode wurden ausschließlich mit dem Stamm *Candida albicans* 3153A durchgeführt. Sie sollten als Vergleich zur Chemilumineszenzmessung dienen, da diese bisher nicht zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies bei Hefen eingesetzt wurde.

Die Superoxidanionen-Produktion wurde durch Messung der Reduktion von azetyliertem Cytochrom c in der An- und Abwesenheit von Superoxiddismutase bestimmt.

Die Untersuchungen wurden in PBS-Lösung und in glukosehaltigem KRPG-Medium durchgeführt, um zum einen eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Chemilumineszenzmessungen und zum anderen mit den Untersuchungen von Danley et al. zu erreichen (Danley et al. 1983). Krebs-Ringer-Phosphat-Glukose-Puffer (KRPG) ist ein serumfreies Kulturmedium. Die hier verwendete Glukosekonzentration betrug 3 g/l.

Entsprechend den Untersuchungen von Danley et al. (Danley et al. 1983) wurden für eine Doppelbestimmung je 2 mal 1,6 ml der Zellsuspensionen 15 min bei 37 °C in Röhrchen inkubiert. Anschließend wurden 0,5 mg Cytochrom c in 0,1 ml Medium (PBS oder KRPG) und entweder 0,1 ml Medium (Probe ohne SOD) oder 300 U SOD in 0,1 ml Medium (Probe mit SOD) zu jedem Röhrchen gegeben. Diese Proben wurden für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 500 x g 5 min zentrifugiert. Die optische Dichte der Überstände wurde bei 550 nm mit dem Spectrophotometer V530 (Fa. Jasco, Groß-Umstedt) gemessen.

Die Superoxidanionen-Konzentration wurde errechnet durch Subtraktion der mittleren OD der Überstände ohne SOD von denen mit SOD und Division der Differenz durch den millimolaren Extinktionskoeffizienten für Cytochrom c ( $23 \text{ mMcm}^{-1}$ ).

### 2.7. Untersuchungen mit Terbinafin

Zur Untersuchung diente der Stamm *Candida albicans* 3153A, der in YEPG-Flüssigmedium kultiviert wurde. Bei einer Temperatur von 25 °C und einer Kulturdauer von 24 h bildeten sich ausschließlich Blastosporen in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Casy-Zellzahl-Meßgerätes (Fa. Schärfe-System, Reutlingen) gemessen.

Für die Chemilumineszenzmessungen wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in NaCl-Lösung hergestellt und mit Terbinafin in verschiedenen Konzentrationen für 10 min und 60 min inkubiert. Als Kontrolle dienten Hefezellen, die ohne Zusatz bzw. mit 10 µl/ml DMSO inkubiert wurden. Der Inkubationszeitraum wurde auf höchstens 60 min beschränkt, um Effekte des Terbinafins auf Wachstum und Zellzahl auszuschließen. Terbinafin wurde in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µg/ml eingesetzt, als Lösungsmittel für Terbinafin wurde DMSO benutzt. Die Chemilumineszenzmessungen

wurden im Luminometer LB953 (Fa. Berthold, Wildbad) durchgeführt. Dafür wurden von jedem Ansatz 6 Proben mit je 200 µl Suspension in Meßröhrchen geben. 200 µl Lucigenin in einer Konzentration von 0,1 mmol/l wurden durch eine Injektionspumpe auf jedes Röhrchen gegeben. Die Meßdauer betrug bei allen Versuchen 20 min, wobei die "slow kinetic" Methode benutzt wurde (Hipler et al.1999 und 1998).

## 2.8. Statistische Auswertung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es quantitative Unterschiede in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von *Candida albicans* gibt. Für den Nachweis der ROS-Bildung wurden zwei Methoden verwendet. Bei der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz wurden von jedem Kulturansatz 6 Proben untersucht. Für die Reduktion von Cytochrom c wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Jede Untersuchung erfolgte mehrfach, mindestens jedoch 3 mal.

Für die statistische Auswertung dieser Arbeit wurden zunächst von allen Daten arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen mit Hilfe des Programmes EXCEL 7.0 von Microsoft errechnet. Zum Vergleich der Standardabweichungen von Daten, die in ihrer Größenordnung und Einheit variierten, wurde der Variationskoeffizient ermittelt.

Die Daten der Blastosporen-Hyphen-Vergleiche wurden mit dem Student t-Test für gepaarte Stichproben analysiert. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Meßergebnisse in den verschiedenen Medien wurde mit Hilfe des t-Test für unabhängige Stichproben untersucht. Dieser statistische Test wurde ebenfalls für den Vergleich der *Candida-albicans*-Stämme CA6 und VIR3 verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  galt als statistisch signifikant.

Der Korrelationskoeffizient wurde als Maß für den Grad der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale bestimmt. Korrelationsanalysen wurden für die Daten der Zellzahlmessungen und Proteinbestimmungen durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient wurde ebenfalls für die Daten der Chemilumineszenzmessungen und des Cytochrom-c-Assay in der Blastosporenphase und im morphologischen Vergleich berechnet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Voruntersuchungen

##### 3.1.1. Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven

Zellzahlbestimmungen wurden vor jeder ROS-Messung und der Hypheninduktion durchgeführt. Für Untersuchungen mit verschiedenen Blastosporenkonzentrationen wurde jede Verdünnungsstufe kontrolliert, um Pipettierfehler und größere Abweichungen von der Soll-Zellzahl auszuschließen. Für die Hypheninduktion wurden nur solche Vorkulturen verwendet, die nach 24 h eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml aufwiesen.

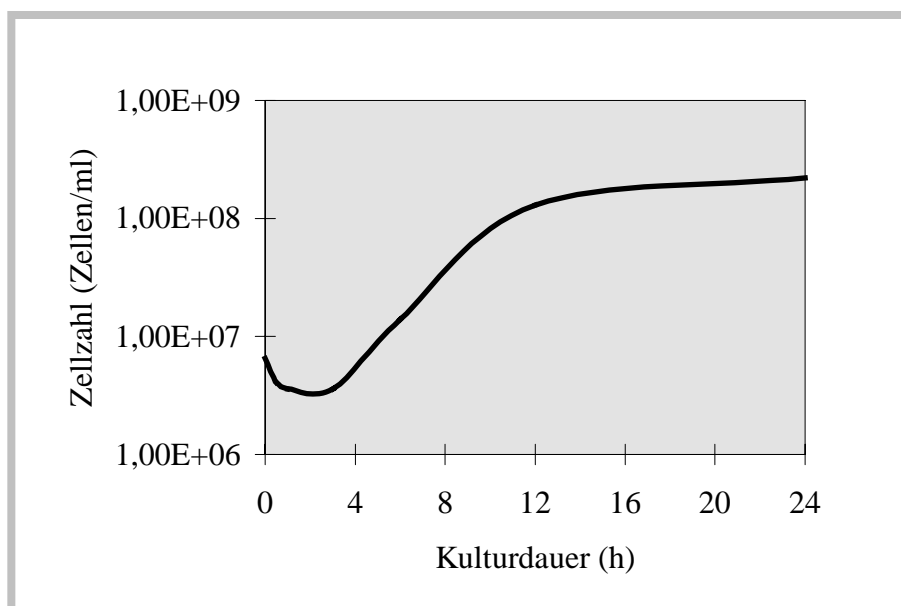


Abb. 8:  
Wachstumskurve  
bei 24-h-Kultur,  
Stamm 3153A.

Das Wachstum der Vorkultur wurde innerhalb von 24 h zur Zuordnung der Wachstumsphasen unter diesen Kulturbedingungen beobachtet. Abbildung 8 zeigt die verschiedenen Phasen des Wachstums:

0 - 4 h: Lag Phase, 4 - 12 h: Exponentielle Wachstumsphase

12 - 21 h: Periode der negativen Akzeleration, 21 - 24 h: Stationäre Phase.

Für die folgenden Untersuchungen fanden solche *Candida-albicans*-Kulturen Verwendung, die sich in der stationären Phase befanden.

## 3.1.2. Hyphenbildung

Die *Candida-albicans*-Stämme 3153A, CA6 und VIR3 wurden unter hypheninduzierenden Bedingungen untersucht. Der Stamm 3153A zeigte nach der 24-h-Vorkultur ausschließlich Blastosporen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden. Nach 30 min unter hypheninduzierenden Bedingungen wiesen 90 % der Zellen eine Keimschlauchbildung auf, nach 60 min hatten 95 % der Zellen Hyphen ausgebildet (Abb. 9 a - c).

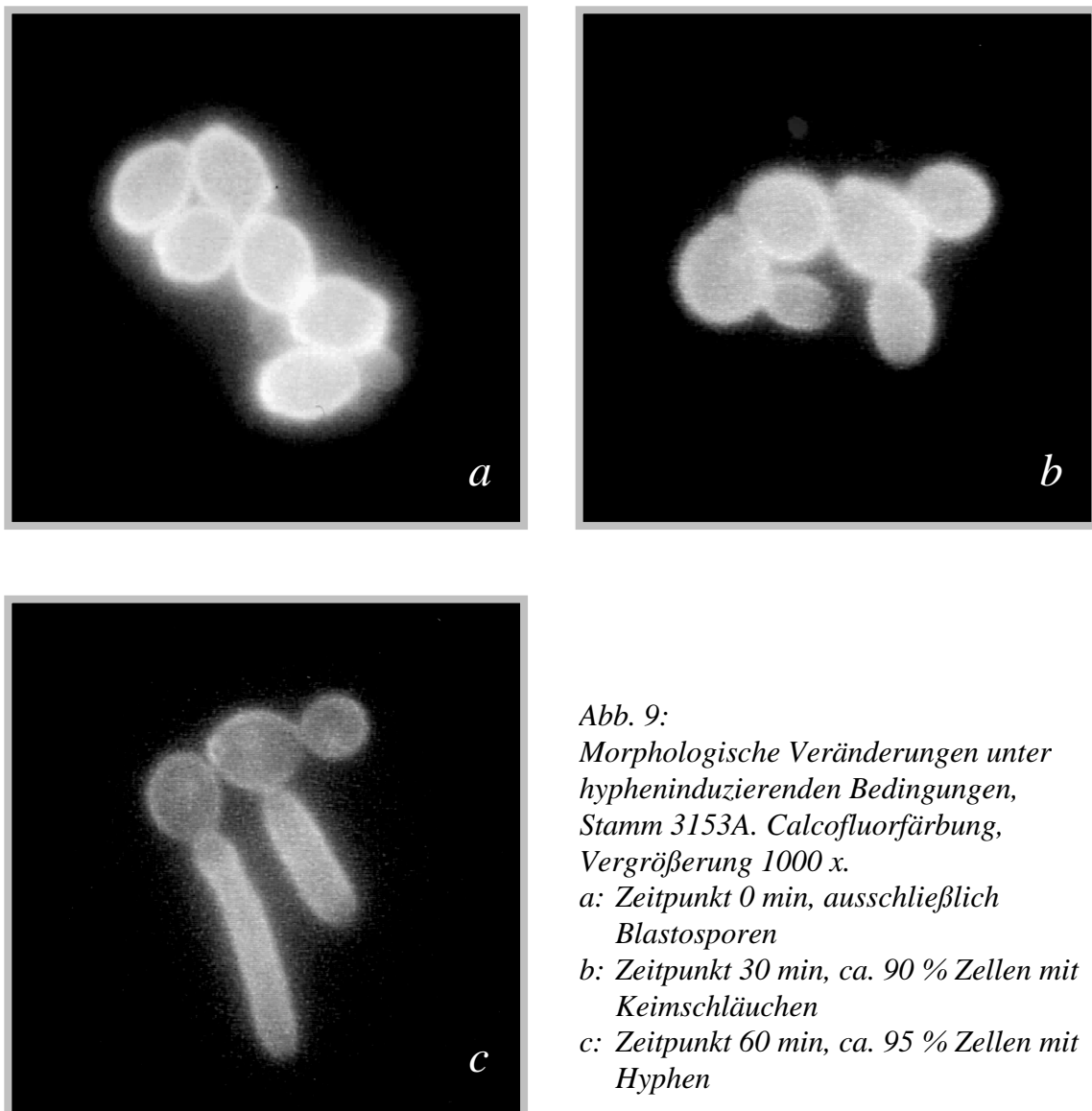


Abb. 9:

*Morphologische Veränderungen unter hypheninduzierenden Bedingungen, Stamm 3153A. Calcofluorfärbung, Vergrößerung 1000 x.*

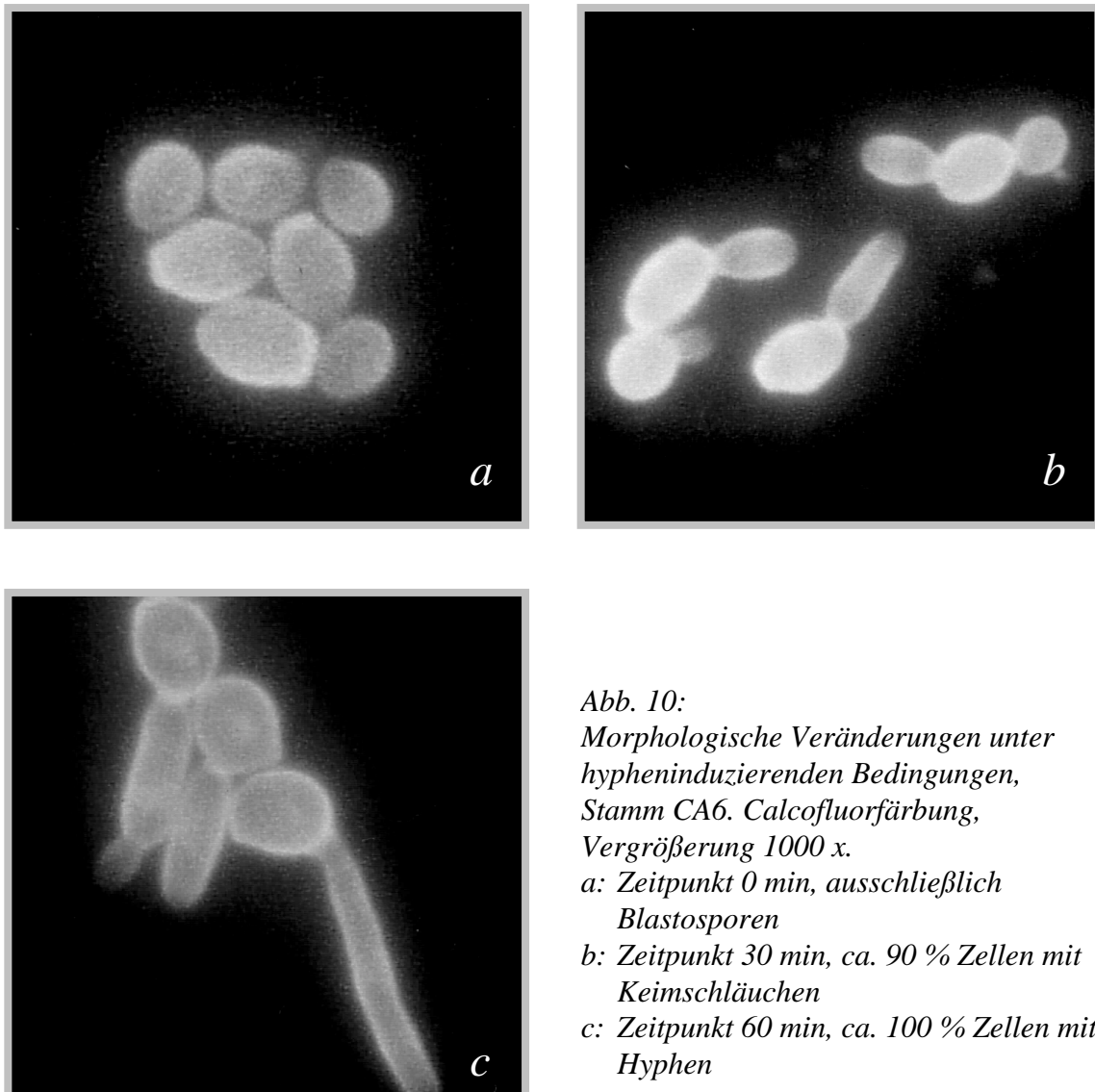
*a: Zeitpunkt 0 min, ausschließlich Blastosporen*

*b: Zeitpunkt 30 min, ca. 90 % Zellen mit Keimschläuchen*

*c: Zeitpunkt 60 min, ca. 95 % Zellen mit Hyphen*

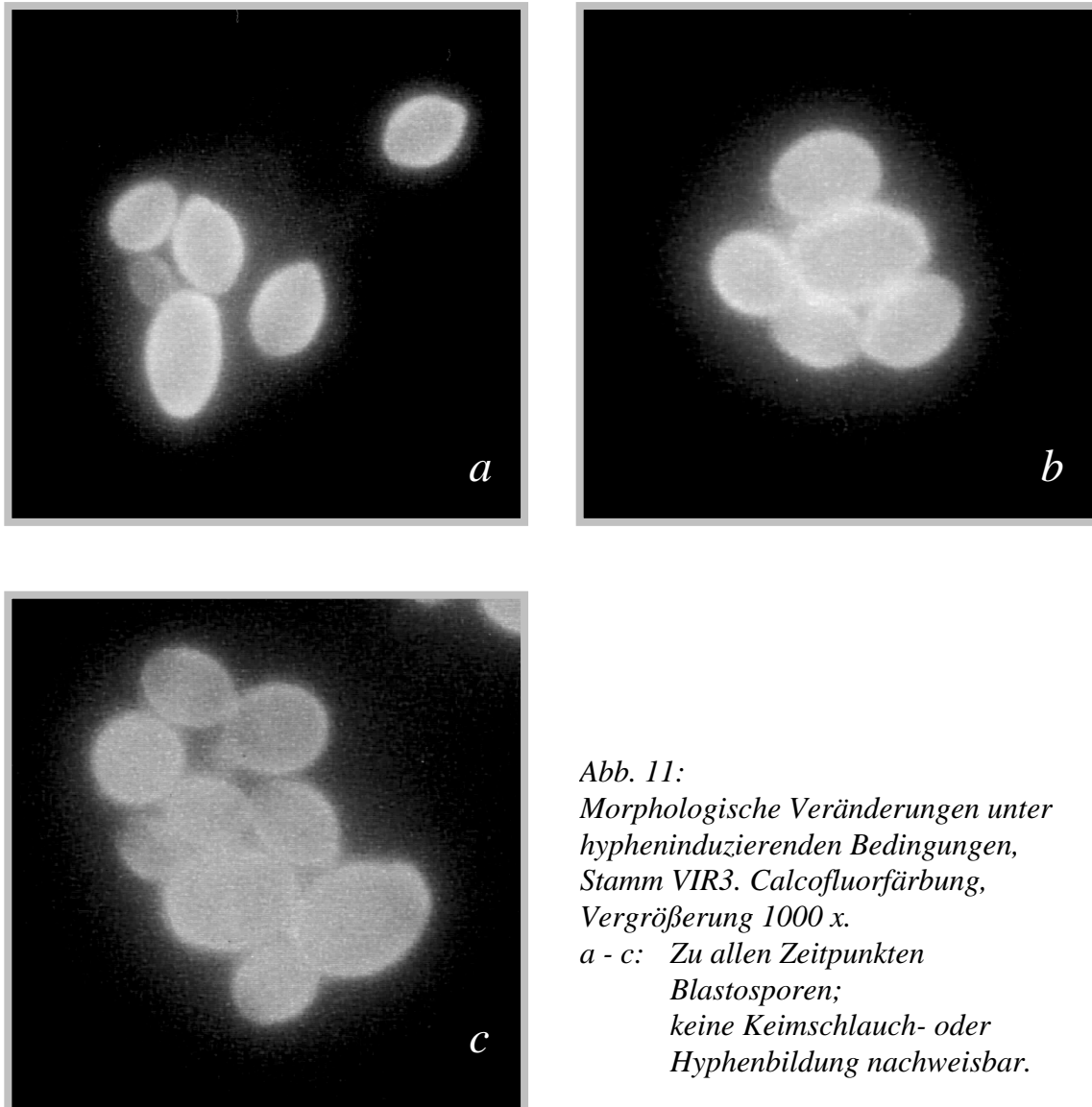
Für den Stamm CA6 konnte bereits nach 30 min unter hypheninduzierenden Bedingungen bei 90 % der Zellen eine Keimschlauchbildung beobachtet werden.. Bei der Hälfte dieser Zellen konnten zu diesem Zeitpunkt bereits Hyphen nachgewiesen werden. Nach 1 h unter diesen Bedingungen hatten alle Zellen Hyphen ausgebildet (Abb. 10).

Die Hyphenbildung verlief deutlich schneller als bei dem *Candida-albicans*-Stamm 3153A (siehe Abb. 9).



**Abb. 10:**  
*Morphologische Veränderungen unter hypheninduzierenden Bedingungen, Stamm CA6. Calcofluorfärbung, Vergrößerung 1000 x.*  
*a: Zeitpunkt 0 min, ausschließlich Blastosporen*  
*b: Zeitpunkt 30 min, ca. 90 % Zellen mit Keimschläuchen*  
*c: Zeitpunkt 60 min, ca. 100 % Zellen mit Hyphen*

Der Stamm VIR3 zeigte bei diesen Bedingungen keine morphologischen Änderungen. Weder nach 30 min noch nach 60 min trat eine Keimschlauch- oder Hyphenbildung auf. Eine Bildung von Pseudohyphen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 11).

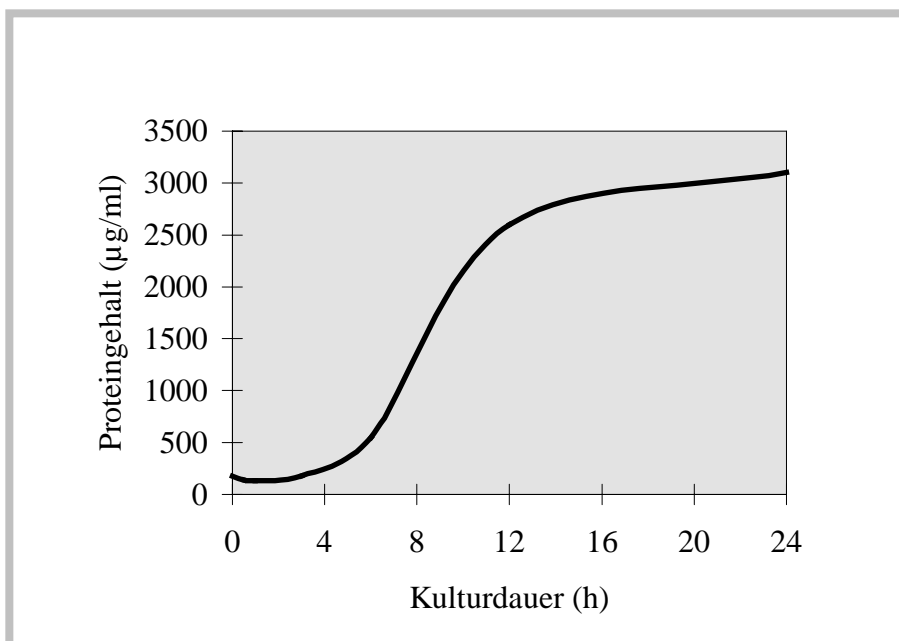


*Abb. 11:  
Morphologische Veränderungen unter  
hypheninduzierenden Bedingungen,  
Stamm VIR3. Calcofluorfärbung,  
Vergrößerung 1000 x.  
a - c: Zu allen Zeitpunkten  
Blastosporen;  
keine Keimschlauch- oder  
Hyphenbildung nachweisbar.*

### 3.1.3. Proteinbestimmung

Um Blastosporen, Zellen mit Keimschläuchen und Hyphen in vergleichbarer Menge bei den ROS-Messungen einsetzen zu können, wurde der Proteingehalt bestimmt. Zunächst wurde der Proteingehalt einer 24-h-Kultur untersucht (Abb. 12).

Es konnte eine positive Korrelation zwischen Zellzahl und Proteingehalt nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient  $r = 0,98$ , siehe Abb. 8 und 12).



*Abb. 12:  
Proteingehalt  
im Verlauf einer  
24-h-Kultur,  
Stamm 3153A.*

Unter diesen Kulturbedingungen wiesen die Blastosporen nach 24 h bei einer Zellzahl von  $10^8$  Zellen/ml einen Proteingehalt von  $2602 \pm 50,5$  µg/ml auf. Bei  $10^7$  Zellen/ml, wie sie für die Proteinbestimmungen bei den Hyphenkulturen verwendet wurden, betrug der Proteingehalt  $255 \pm 35,4$  µg/ml.

Während der Hyphenbildung war mikroskopisch ein Volumenzuwachs zu beobachten; eine Veränderung der Zellzahl war jedoch nicht meßbar. Eine wesentliche Änderung des Proteingehaltes konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Tab. 4).

| <b>Zellmorphologie</b>            | <b>Zellzahl (Zellen/ml)</b> | <b>Proteingehalt (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------|--|
| Blastosporen (24-h-Kultur)        | $0,94 \times 10^7$          | $255 \pm 35,4$                                     |
| Blastosporen (nach 30 min)        | $0,68 \times 10^7$          | $191 \pm 41,0$                                     |
| Blastosporen (nach 60 min)        | $0,64 \times 10^7$          | $261 \pm 53,4$                                     |
| Keimschlauchbildung (nach 30 min) | $0,73 \times 10^7$          | $236 \pm 23,3$                                     |
| Hyphenbildung (nach 60 min)       | $0,64 \times 10^7$          | $245 \pm 25,7$                                     |

*Tab. 4: Darstellung der Zellzahl und des Proteingehaltes für die morphologischen Untersuchungen. Stamm Candida albicans 3153A.*

Bei allen Versuchen wurde jeweils eine Ausgangskonzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml gewählt und gleiche Konzentrationen von Zellen mit Keimschlauch- oder Hyphenbildung eingesetzt.

### 3.2. Untersuchungen des virulenten Stammes 3153A

#### 3.2.1. Chemilumineszenzmessungen

Die Untersuchungen mittels lucigeninverstärkter Chemilumineszenz zeigten eine zellzahlabhängige Bildung von ROS in der Blastosporenphase (Abb. 13). Meßbare Cl-Signale konnten bei Konzentrationen  $> 10^5$  Zellen/ml nachgewiesen werden. Für Konzentrationen  $> 10^8$  Zellen/ml war die ROS-Bildung gehemmt.

Die Werte betragen für  $10^6$  Zellen/ml  $730 \pm 110$  cpm und im Maximum für  $10^8$  Zellen/ml  $27\ 010 \pm 1\ 990$  cpm in PBS-Medium.

Messungen in YEPG-Medium zeigten signifikant niedrigere ROS-Werte für die Zellzahlen  $1 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^9$  Zellen/ml ( $p < 0,001$ ).

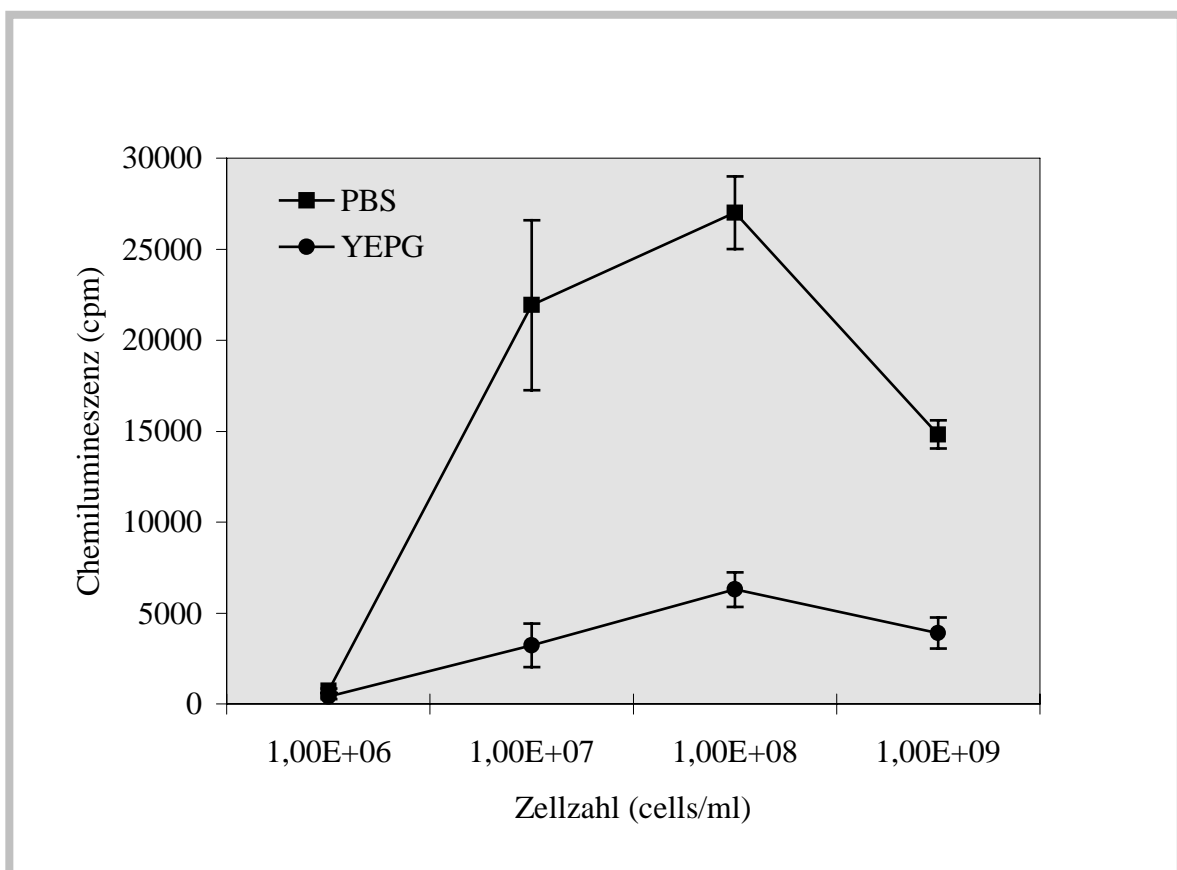


Abb. 13: Einfluß der steigenden Zellzahl von *Candida-albicans*-Blastosporen (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS, gemessen als lucigeninverstärkte Chemilumineszenz in verschiedenen Medien (PBS und YEPG).

Eine gesteigerte ROS-Bildung konnte während der Hypheninduktion sowohl nach 30 min als auch nach 60 min unter induzierenden Bedingungen gemessen werden (Abb. 14). Zellen, die Keimschläuche ausgebildet hatten, bildeten bereits mehr ROS als Blastosporen. Während der Hyphenphase konnte ein weiterer Anstieg der ROS-Bildung nachgewiesen werden. In PBS waren die Werte für Blastosporen  $27\,010 \pm 1\,990$  cpm, nach der Keimschlauchbildung  $40\,800 \pm 1\,356$  cpm und in der Hyphenphase  $90\,583 \pm 7\,105$  cpm. In PBS-Lösung unterschieden sich die Werte der ROS-Bildung von Hyphen und Zellen mit Keimschläuchen signifikant von denen der Blastosporen ( $p < 0,001$ ). Ein Anstieg der ROS-Bildung konnte ebenso bei Messungen in YEPG-Medium beobachtet werden. Auch hier erreichten die Unterschiede zwischen Blastosporen und Keimschläuchen beziehungsweise Keimschläuchen und Hyphen das Signifikanzniveau ( $p < 0,001$ ). Messungen in PBS unterschieden sich in allen 3 morphologischen Phasen von denen in YEPG-Medium. Kontrollen ohne Hyphenbildung führten zu keinem signifikanten Anstieg der Chemilumineszenzsignale (Daten nicht dargestellt, siehe 2.2.2.).

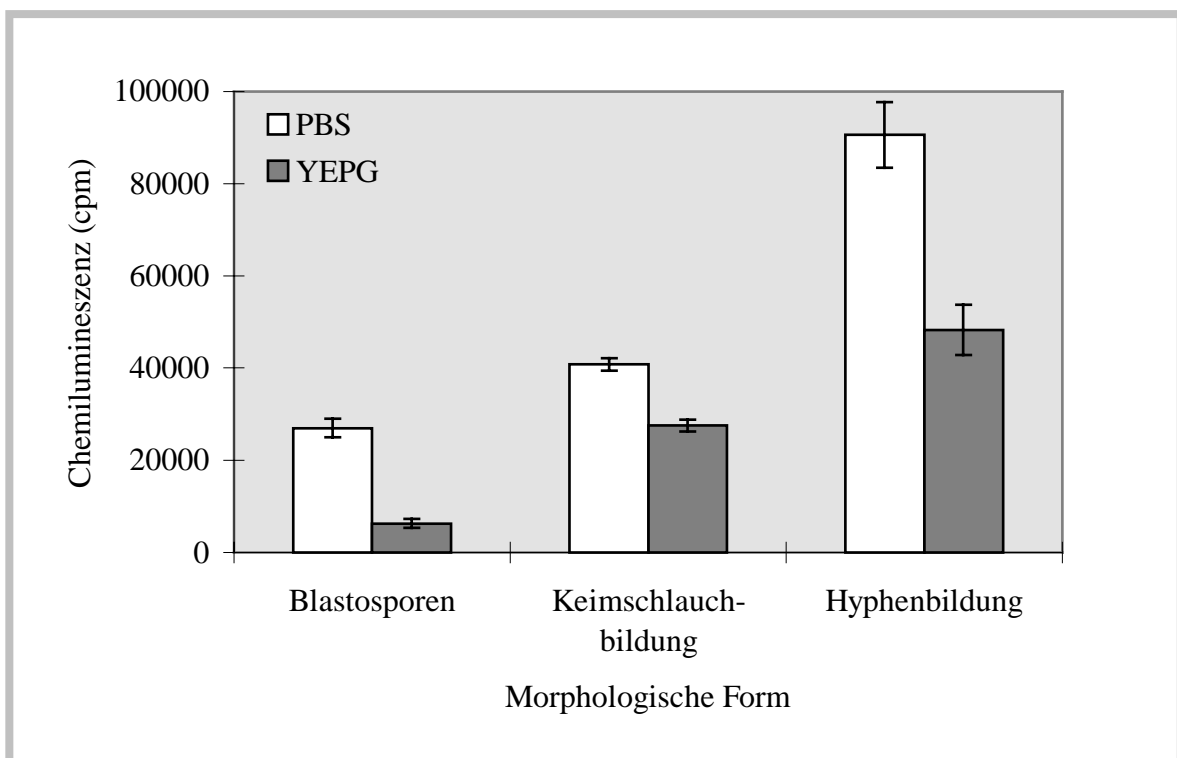


Abb. 14: Einfluß von verschiedenen morphologischen Formen bei *Candida albicans* (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS, gemessen als Chemilumineszenz in verschiedenen Medien. Nach der Keimschlauchbildung und in der Hyphenphase konnte in beiden Medien ein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt.



### 3.2.2. Reduktion von Cytochrom c

Die Ergebnisse der Cl-Methode konnten durch den Cytochrom-c-Assay bestätigt werden. Eine Reduktion von Cytochrom c wurde bei Blastosporenkonzentrationen  $> 10^5$  Zellen/ml gemessen. Das Maximum lag bei den Messungen in beiden Medien bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Bei Zellzahlen  $> 10^8$  Zellen/ml war die ROS-Bildung gehemmt (Abb. 15). Die Werte der Messungen in PBS und dem glukosehaltigen Medium KRPG, das bereits für Messungen mit dieser Methode verwendet wurde, unterschieden sich nicht signifikant.

Im Vergleich zwischen der Chemilumineszenz- und der Cytochrommethode ließ sich eine positive Korrelation bei den Messungen in der Blastosporenphase nachweisen. Für den Vergleich in PBS-Lösung betrug der Korrelationskoeffizient  $r = 0,88$  (siehe Abb. 13 und 15).

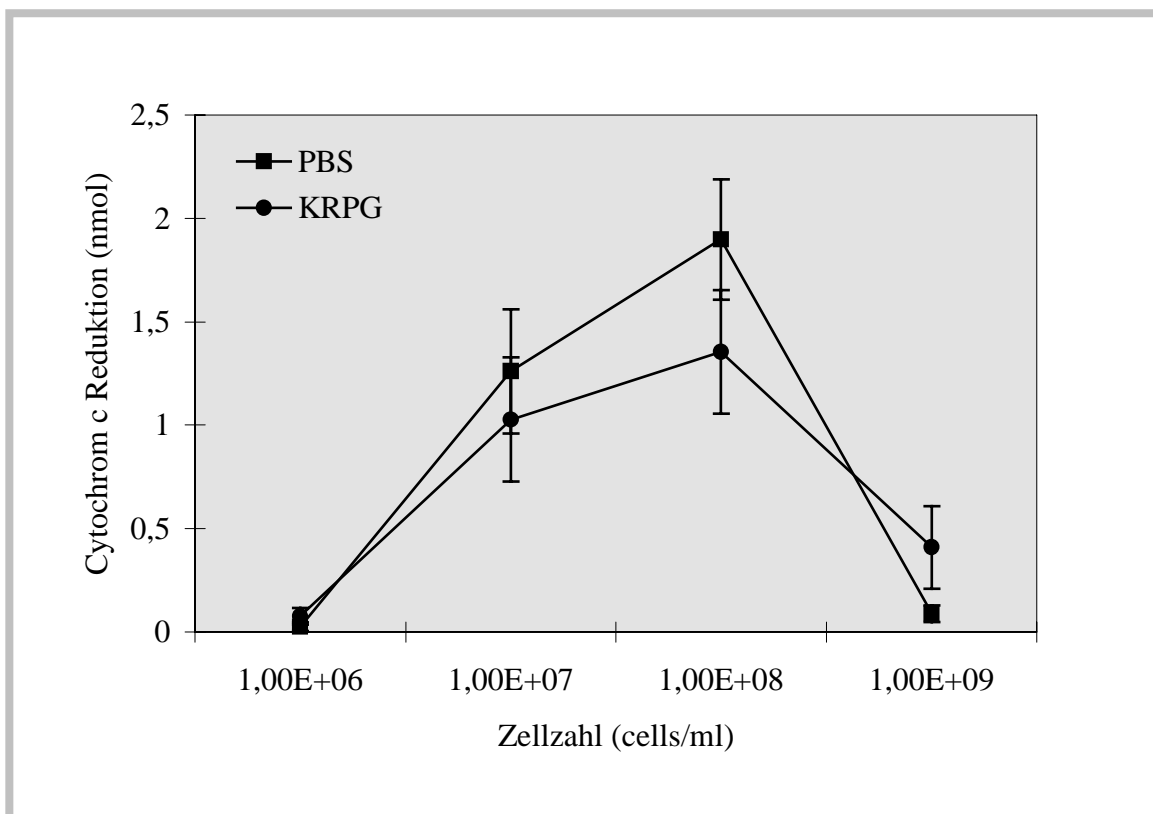


Abb. 15: Einfluß von steigender Blastosporenzahl (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS. Cytochrom-c-Assay in verschiedenen Medien (PBS und KRPG).

Während der Hyphenbildung stieg die Reduktion von Cytochrom c signifikant an. In PBS-Lösung betragen die Werte bei vergleichbarem Proteingehalt  $1,62 \pm 0,33$  nmol  $\cdot O_2^-$  für die Blastosporen,  $2,94 \pm 0,41$  nmol  $\cdot O_2^-$  nach der Keimschlauchbildung und  $3,85 \pm 0,22$  nmol  $\cdot O_2^-$  in der Hyphenphase (Abb. 16). Das entsprach gegenüber den Blastosporen einer 1,8-fachen Steigerung für die Keimschlauchbildung und einer 2,4-fachen Steigerung für die Hyphenphase ( $p < 0,001$ ).

Messungen, die im glukosehaltigen Medium KRPG durchgeführt wurden, unterschieden sich nicht signifikant von Messungen in PBS. Die Kontrollgruppen führten zu keinem signifikanten Anstieg der Reduktion von Cytochrom c (Daten nicht dargestellt, siehe 2.2.2.).

Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Cl- und Cytochrommethode nachgewiesen werden. Für Messungen in PBS betrug der Korrelationskoeffizient im morphologischen Vergleich  $r = 0,91$  (siehe Abb. 14 und 16).

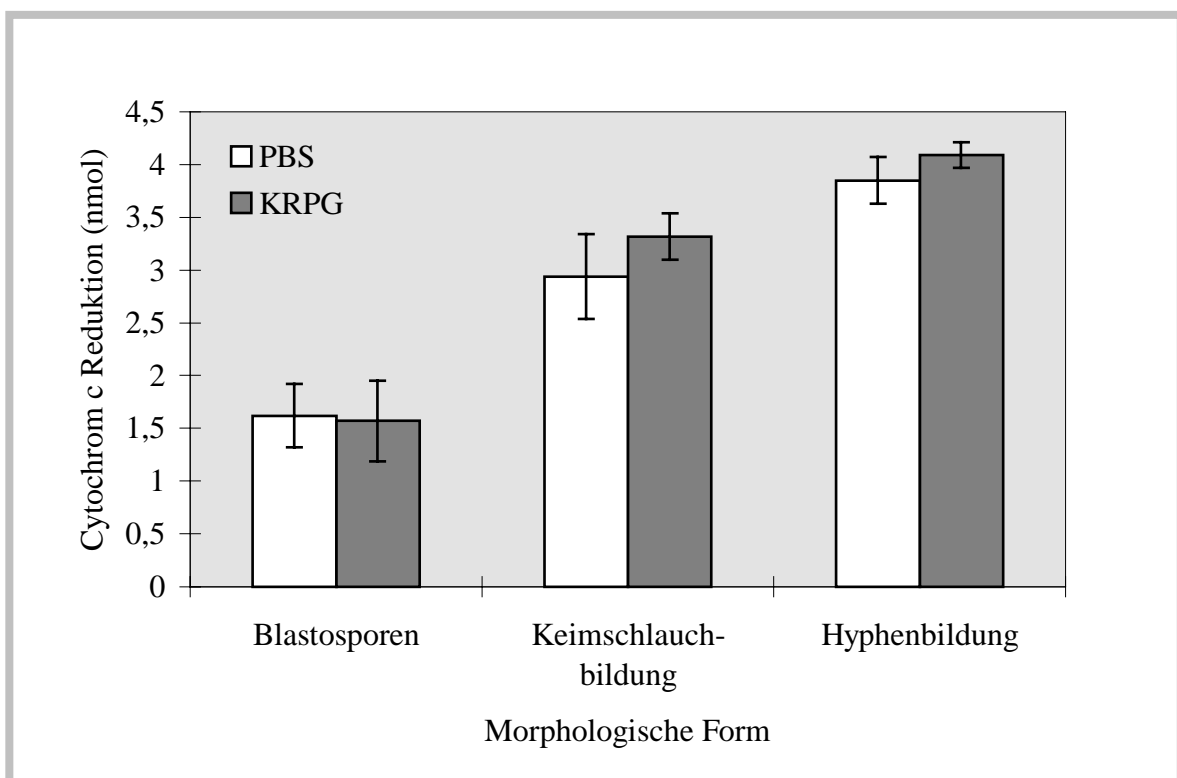


Abb. 16: *Einfluß verschiedener morphologischer Formen bei Candida albicans (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS. Cytochrom-c-Assay in verschiedenen Medien. Nach der Keimschlauchbildung und in der Hyphenphase konnte in beiden Medien ein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt.*

### 3.2.3. Einfluß der Terbinafinzugabe auf die ROS-Bildung

Der Einfluß des Antimykotikums Terbinafin auf die Radikalbildung wurde in der Blastosporenphase untersucht.

Die Chemilumineszenzmessungen wurden mit einer Zellzahl von  $10^8$  Zellen/ml durchgeführt, da dabei die maximale Radikalbildung der Blastosporen nachzuweisen war (siehe Abb. 13). Nach 10-minütiger Inkubation der Hefezellen mit Terbinafin zeigte sich eine deutliche Abnahme der liberierten Radikale. DMSO *per se* als Lösungsmittel für Terbinafin besaß bereits antioxidative Eigenschaften. Die Hemmung der Radikalbildung wurde jedoch wesentlich von der eingesetzten Terbinafinkonzentration beeinflusst. Bei einer Terbinafinkonzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  entsprach die Hemmung bereits 9,4 %, bei  $100 \mu\text{g/ml}$  24,0 % (Abb. 17). Der Unterschied der cpm-Werte der höchsten Terbinafinkonzentration (T 100) zu der Kontrollgruppe mit DMSO erreichte das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ).

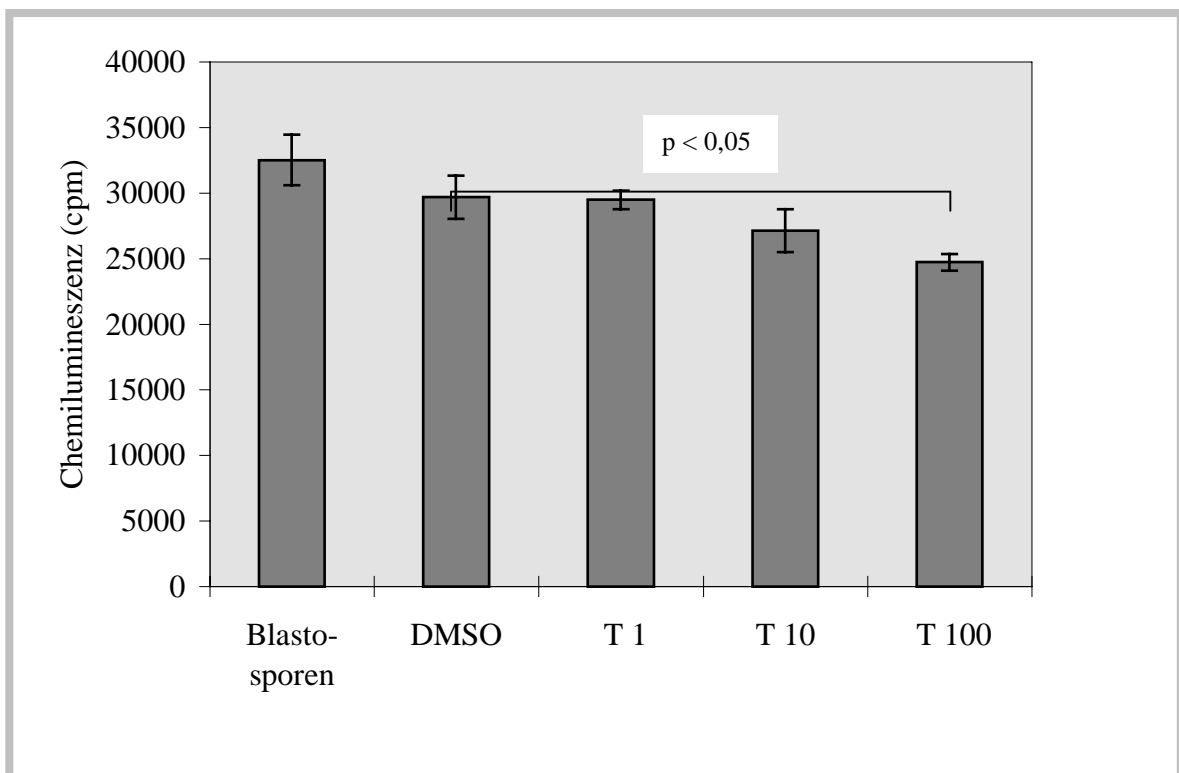


Abb. 17: Konzentrationsabhängige Hemmung der ROS-Bildung nach 10-minütiger Inkubation mit Terbinafin. Stamm 3153A.

Blastosporen: Zellzahl =  $1 \times 10^8$  Zellen/ml, alle anderen Ansätze enthielten zusätzlich die angegebene Konzentration von Terbinafin oder DMSO.

DMSO: + 1 % DMSO, T1: +  $1 \mu\text{g/ml}$  Terbinafin,

T10: +  $10 \mu\text{g/ml}$  Terbinafin, T100: +  $100 \mu\text{g/ml}$  Terbinafin.

Nach 60-minütiger Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen von Terbinafin wurde dieser Hemmeffekt noch deutlicher. Bei einer Terbinafinkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  entsprach die Hemmung 18,0 %, bei 100  $\mu\text{g/ml}$  41,1 % (Abb. 18). Unterschiede auf dem Signifikanzniveau wurden bereits für Terbinafinkonzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  in Bezug zur Kontrollgruppe mit DMSO erreicht ( $p < 0,05$ ). Bei der höchsten Terbinafinkonzentration wurde dieser Unterschied noch deutlicher ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse zeigten eine Dosis- und Zeitabhängigkeit der terbinafininduzierten ROS-Hemmung.

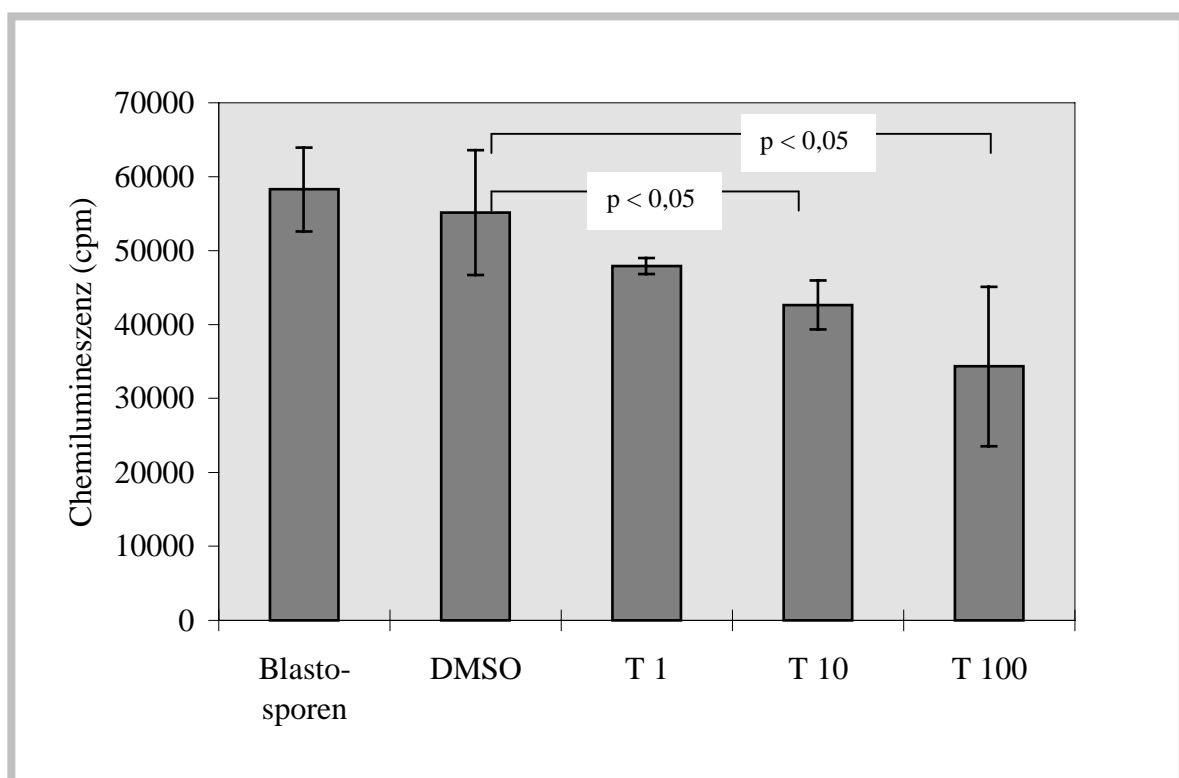


Abb. 18: Konzentrationsabhängige Hemmung der ROS-Bildung nach 60-minütiger Inkubation mit Terbinafin. Stamm 3153A.

Blastosporen: Zellzahl =  $1 \times 10^8$  Zellen/ml, alle anderen Ansätze enthielten zusätzlich die angegebene Konzentration von Terbinafin oder DMSO.

DMSO: + 1 % DMSO, T1: + 1  $\mu\text{g/ml}$  Terbinafin,

T10: + 10  $\mu\text{g/ml}$  Terbinafin, T100: + 100  $\mu\text{g/ml}$  Terbinafin.

### 3.3. Vergleich der Stämme CA6 und VIR3

Es wurden der virulente Stamm CA6 und seine avirulente und agerminative Mutante VIR3 hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur ROS-Bildung verglichen.

Wie mit Hilfe der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz gezeigt werden konnte, unterschieden sich die beiden Stämme bei der ROS-Bildung bereits in der Blastosporenphase. CA6 zeigt signifikant höhere Werte als die Mutante bei einer Zellzahl von  $10^7$  Zellen/ml und  $10^8$  Zellen/ml ( $p < 0,05$ ).

Die Werte betragen bei CA6 für  $10^7$  Zellen/ml  $45\,915 \pm 5\,261$  cpm und bei VIR3  $34\,027 \pm 2\,207$  cpm. Bei CA6 wurden für  $10^8$  Zellen/ml  $73\,498 \pm 15\,643$  cpm und bei VIR3  $32\,822 \pm 14\,601$  cpm gemessen (Abb. 19).

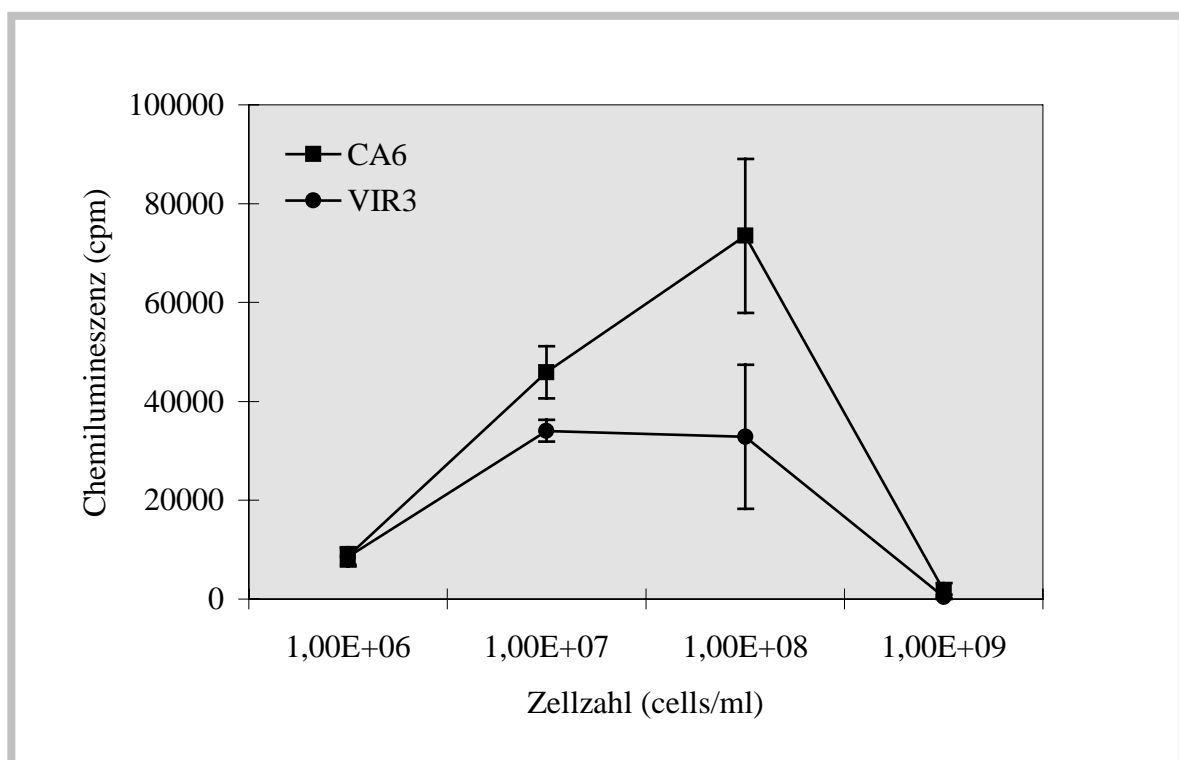


Abb. 19: Vergleich der ROS-Bildung von Blastosporen des virulenten Stammes CA6 und seiner avirulenten und agerminativen Mutante VIR3. Chemilumineszenzmessungen in PBS-Medium.

Wenn die Zellen unter hypheninduzierenden Bedingungen inkubiert wurden, zeigte nur der Stamm CA6 morphologische Veränderungen. Bereits nach 30 min hatten ca. 90 % der Zellen Keimschläuche oder Hyphen ausgebildet. Lange Hyphen konnten bei fast allen Zellen nach 60 min beobachtet werden.

Nach 30 min unter Induktionsbedingungen stieg die ROS-Bildung bei beiden Stämmen an, die Werte betragen für CA6  $104\,338 \pm 3\,697$  cpm und für VIR3  $63\,297 \pm 7\,221$  cpm. Das entsprach einem 2,5-fachen Anstieg für beide Stämme. Die ROS-Bildung durch den Stamm CA6 war signifikant größer ( $p < 0,001$ ).

Nach 60 min unter induktiven Bedingungen war eine Abnahme der ROS-Bildung bei beiden Stämmen nachzuweisen, wobei die Werte für den Stamm VIR3 größer waren (Abb. 20).

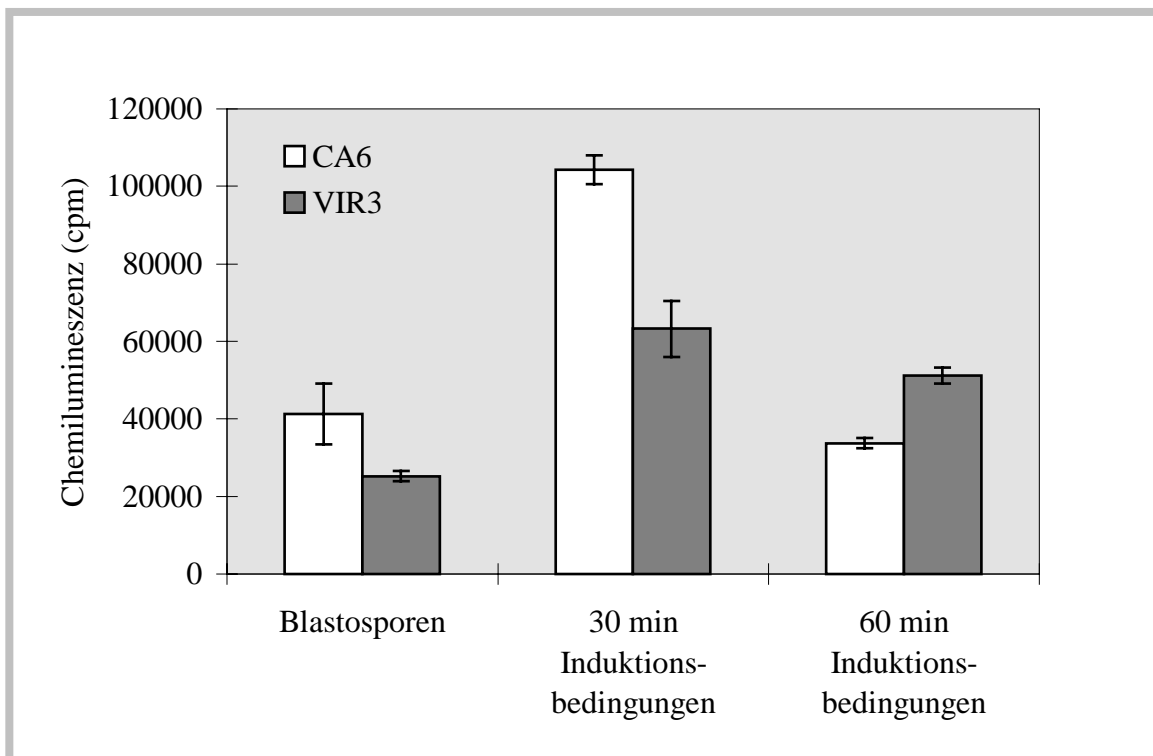


Abb. 20: Vergleich der ROS-Bildung von CA6 und VIR3 unter hypheninduzierenden Bedingungen. Messung als Chemilumineszenz in PBS-Medium. VIR3 zeigte keine Hyphenbildung, bei CA6 war eine Keimschlauch- und Hyphenbildung bereits nach 30 min nachweisbar. Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt.

## 4. Diskussion

*Candida albicans* bildet extrazellulär meßbare Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (Danley et al. 1983, Eremina et al. 1981). Bisher ist jedoch in Arbeiten zu möglichen Virulenzfaktoren von *Candida albicans* der ROS-Bildung wenig oder gar keine Beachtung geschenkt worden (Odds 1994 und 1988, Cutler 1991).

Einige Studien haben den stimulierenden Einfluß von *Candida albicans* auf den „respiratory burst“ von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMNL) untersucht, ohne jedoch den Beitrag, den *Candida albicans* zur ROS-Bildung leistet, zu berücksichtigen (Vazques-Torres et al. 1997, Borg-von-Zepelin et al. 1992).

Auch Endothelzellen bilden nach Stimulation mit *Candida albicans* reaktive Sauerstoffspezies (Fratti et al. 1998). In jener Studie wurde ebenfalls die mögliche Beteiligung von *Candida albicans* bei der ROS-Produktion vernachlässigt.

In einem Modell der hämatogenen *Candida*-Pyelonephritis wurde gezeigt, daß hyphenbildende Stämme eine signifikant höhere Pathogenität besaßen. Im untersuchten Nierengewebe konnte oxidativ induzierter Streß mit einer Beteiligung von Sauerstoffradikalen durch Messung der Lipidperoxidase- und Superoxiddismutasespiegel nachgewiesen werden. Reaktive Sauerstoffspezies wurden für das Fortschreiten der Inflammation verantwortlich gemacht. Allerdings wurde lediglich die Infiltration von Leukozyten bei der Entstehung des oxidativen Streß berücksichtigt (Nishikawa et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von *Candida albicans* im Vergleich der verschiedenen morphologischen Formen Blastosporen, Keimschläuche und Hyphen untersucht. Da dem Dimorphismus eine entscheidende Rolle bei der Pathogenität dieser Spezies zukommt, können Kenntnisse über die StoffwechsellLeistungen in den verschiedenen morphologischen Phasen zum Verständnis der Pathophysiologie von *Candida-albicans*-Infektionen beitragen.

#### 4.1. Voruntersuchungen

In den Voruntersuchungen wurde zunächst das Wachstumsverhalten der *Candida-albicans*-Stämme unter den gewählten Kulturbedingungen untersucht. Nach 24 h Kulturdauer in YEPG-Medium betrug die Zellzahl  $1 \times 10^8$  Zellen/ml, die Zellen befanden sich in der stationären Wachstumsphase. Diese Phase wurde deshalb für die folgenden Untersuchungen ausgewählt, weil hier die Zellzahl mit ihrem großen Einfluß auf die Radikalbildung konstant bleibt. Die Hypheninduktion gelingt optimal aus Vorkulturen in der stationären Wachstumsphase (Odds 1985). Die eingesetzte Zellzahl sollte nicht höher als  $5 \times 10^6$  Zellen/ml sein, da sonst die Hyphenbildung inhibiert werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, daß *Candida albicans* bei höheren Zellzahlen eine Substanz bildet, die die Hyphenbildung verhindert (Hazen und Cutler 1979, Evans et al. 1975).

Die Hyphenbildung wurde in den *Candida-albicans*-Stämmen 3153A, CA6 und VIR3 über einen Zeitraum von maximal 60 min untersucht. Quantitative und qualitative Untersuchungen waren zu späteren Zeitpunkten durch Konglomerate der Hyphen untereinander erschwert. Für den virulenten Stamm 3153A konnte nach 60 min bei 95 % der Zellen eine Hyphenbildung mikroskopisch nachgewiesen werden. Bei dem pathogenen Stamm CA6 verlief die Hyphenbildung schneller. Bereits nach 30 min hatten 50 % der Zellen Hyphen ausgebildet, nach 60 min waren es 100 %. Bei der avirulenten und agerminativen Mutante VIR3 gelang unter den gewählten Bedingungen keine Hypheninduktion.

Zur Quantifizierung der *Candida-albicans*-Proben wurde zusätzlich zu den Zellzahlbestimmungen der Proteingehalt in den 24-h-Kulturen und während der Hyphenbildung untersucht. Für die 24-h-Kultur konnte eine positive Korrelation zwischen Zellzahl und Proteingehalt nachgewiesen werden. Bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml betrug der Proteingehalt etwa 2600 µg/ml, ein Ergebnis, das auch in anderen Arbeiten bestätigt wurde (Odds 1985). Während der Hyphenbildung gibt es nur wenige Studien zu Veränderungen des Proteingehaltes (Sullivan et al. 1983, Dastidar 1966). Während dieses Vorgangs wurde eine Erhöhung der Trockenmasse und des Volumens bei gleichbleibender Zellzahl beschrieben (Odds 1985). Während der DNA-Gehalt bei Blastosporen und Hyphen noch unverändert ist, kommt es zu einer Verdopplung des RNA-Gehaltes (Shepherd et al. 1980, Yamaguchi 1974).



In der vorliegenden Arbeit konnte während der Hypheninduktion von 60 min weder eine signifikante Änderung der Zellzahl noch des Proteingehaltes nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, daß in den morphologischen Vergleichen zur ROS-Bildung von Blastosporen, Keimschläuchen und Hyphen mit einer Ausgangskonzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml vergleichbare Mengen der Zellen eingesetzt wurden.

#### 4.2. ROS-Bildung und Dimorphismus

Anhand der Untersuchungen mit dem humanpathogenen *Candida-albicans*-Stamm 3153A konnte gezeigt werden, daß eine Konzentrationsabhängigkeit der ROS-Bildung in der Blastosporenphase vorliegt. Eine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies war ab einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml nachweisbar. Das Maximum der ROS-Bildung wurde bei  $1 \times 10^8$  Zellen/ml beobachtet. Diese Zellzahl besitzt *in vivo* eine hohe pathogene Bedeutung (Jehn 1997, Weber 1993). Die verschiedenen Kulturmedien hatten einen großen Einfluß; die maximale ROS-Bildung konnte bei Messungen in PBS nachgewiesen werden. In YEPG-Medium war die ROS-Bildung signifikant vermindert. Der durch den Mangel an Nährstoffen in PBS verursachte Stress könnte zu einer Verstärkung der ROS-Bildung führen. Eine weitere Erklärung dieses Effektes könnten lichtabfangende Eigenschaften von Kulturmedien darstellen. In Untersuchungen mit yeast-extract-haltigen Medien wurde eine Verminderung der Chemilumineszenz durch eine Unterdrückung der Lichtemission beschrieben (Van Poucke und Nelis, 1997).

Im morphologischen Vergleich von Blastosporen, Zellen mit Keimschlauchbildung und Hyphen konnten signifikante Unterschiede in der Bildung von ROS aufgezeigt werden. Zellen mit Keimschläuchen bildeten bereits signifikant mehr ROS als Blastosporen ( $p < 0,001$ ). In der Hyphenphase war ein weiterer signifikanter Anstieg nachweisbar ( $p < 0,001$ ). Die Werte stiegen bis auf das 12-fache für den Vergleich von Blastosporen und Hyphen in YEPG-Medium. Die Ergebnisse erreichten das Signifikanzniveau sowohl in PBS als auch in YEPG-Kulturmedium. Der Anstieg der Radikalbildung während der Hyphenbildung war also nicht direkt vom umgebenden Medium abhängig.

Die Messung der ROS-Bildung mittels lucigeninverstärkter Chemilumineszenz wird in Bezug auf Art der nachgewiesenen Radikale und Ort der Messung kontrovers diskutiert (Galutzov und Genva 1997, Klinger et al. 1996, Mc Kinney et al. 1996).

Zum Vergleich mit der Chemilumineszenzmessung wird häufig der Cytochrom-c-Assay hinzugezogen (Deliconstantinos et al. 1997, Storch und Ferber 1987, Minkenberg und Feber 1984). Diese Methode wurde bereits zum Nachweis der ROS-Bildung in der Blastosporenphase von *Candida albicans* verwendet (Danley et al. 1983) und fand deshalb als Vergleichsmessung auch in dieser Arbeit Verwendung. Der Cytochrom-c-Assay ist spezifisch für den extrazellulären Nachweis von Superoxidanionenradikalen, zeigt allerdings eine geringere Empfindlichkeit als die lucigeninverstärkte Chemilumineszenz (Storch und Ferber 1987).

In dieser Arbeit konnte eine positive Korrelation beider Methoden sowohl für die Untersuchungen in der Blastosporenphase ( $r = 0,88$ ) als auch während des morphologischen Vergleiches nachgewiesen werden ( $r = 0,91$ ). Beide Methoden sind daher geeignet für den Nachweis der ROS-Bildung von *Candida albicans*. Für die Chemilumineszenzmessung konnten aber deutliche Vorteile gegenüber der Cytochrom-c-Methode in Meßdauer (20 min versus 60 min), Probenvolumen (200  $\mu$ l versus 1,6 ml) sowie Kinetik (Meßwerte alle 1,9 min versus 1 Meßwert) und Genauigkeit (Variationskoeffizienten bis 20 % versus 50 %) verifiziert werden.

In beiden Methoden konnte eine ROS-Bildung in der Blastosporenphase ab einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml nachgewiesen werden. Das Maximum zeigte sich bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Bei höheren Zellzahlen war die ROS-Bildung gehemmt, was möglicherweise einen protektiven Mechanismus der Zellen darstellt.

Danley et al. konnten eine bedeutende Aktivität der Hefezellen im Cytochrom-c-Assay bereits bei niedrigeren Zellzahlen nachweisen, was durch die differierenden Bedingungen bezüglich Medium, Inkubationszeit und verwendeten *Candida-albicans*-Stämmen verursacht sein könnte (Danley et al. 1983).  $3 \times 10^5$  Zellen bildeten etwa  $1,1 \text{ nmol } \cdot \text{O}_2^-$  und  $3 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^7$  Zellen bildeten jeweils etwa  $1,7 \text{ nmol } \cdot \text{O}_2^-$ . In verschiedenen Methoden zum Nachweis von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) konnte gezeigt werden, daß die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung am höchsten in Hefezellkulturen von  $1 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^6$  Hefezellen war und in Kulturen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen deutlich abfiel. Eremina et al. verwendeten eine weitere Methode, um  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Kulturfiltraten von verschiedenen *Candida*-Spezies nachzuweisen. Sie berichteten über eine meßbare  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung während des Logphase-Wachstums und in der stationären Phase (Eremina et al. 1981).

Wie in der vorliegenden Arbeit in vergleichenden Experimenten gezeigt wurde, hatte das Medium, das für die Cytochrom-c-Messung benutzt wurde, einen meßbaren Einfluß auf die ROS-Menge. Die Ergebnisse im KRPG-Medium, das auch von Danley et al. für den Cytochrom-c-Assay benutzt wurde, unterschieden sich aber nicht signifikant von den Messungen in PBS (Danley et al. 1983). Der Zusatz von Glukose schien keinen direkten Einfluß auf die ROS-Freisetzung zu haben.

Auch im Cytochrom-c-Assay konnte eine deutlich gesteigerte ROS-Bildung während der Keimschlauch- und Hyphenbildung nachgewiesen werden. Während der Keimschlauchbildung war eine signifikante Steigerung der ROS-Bildung meßbar ( $p < 0,001$ ). In der Hyphenphase war ein weiterer signifikanter Anstieg nachweisbar ( $p < 0,001$ ). Die höchsten Werte wurden bei den Untersuchungen in PBS gemessen.

Für den *Candida-albicans*-Stamm 3153A konnte während der Hypheninduktion eine signifikante Steigerung der ROS-Bildung unabhängig vom Umgebungsmedium nachgewiesen werden.

#### 4.3. Einfluß von Terbinafin auf die ROS-Bildung

Terbinafin ist ein Antimykotikum der Allylaminklasse und besitzt antioxidative Eigenschaften. Von Camera et al. konnte nachgewiesen werden, daß therapeutische Dosierungen von Terbinafin *in vitro* als Radikalfänger fungieren und *in vivo* eine antiinflammatorische Aktivität ausüben können (Camera et al. 1999). Die Eigenschaften *in vitro* lassen sich durch die chemische Struktur begründen. Terbinafin besitzt freie Bindungsstellen, die mit reaktiven Sauerstoffspezies reagieren können (Camera et al. 1999). Darüber hinaus scheint die Substanz mit Zellmembranen zu interagieren und somit die Bildung von ROS zu hemmen (Vago et al. 1994, Ryder 1992).

Naftitin, ein weiteres Antimykotikum der Allylaminklasse, kann die Chemilumineszenz und Superoxidanionenradikal-Produktion von PMNL hemmen (Evans et al. 1993, Solomon et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Antimykotikums und Radikalfängers Terbinafin auf die ROS-Bildung von *Candida albicans* während der Blastosporenphase untersucht. Es konnte eine dosis- und zeitabhängige Verminderung der ROS-Produktion

durch Terbinafin nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit der Blastosporen von 10 min bei einer Terbinafinkonzentration von 100 µg/ml konnte eine signifikante Reduktion der ROS-Bildung beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Nach 60 min wurde eine signifikante Reduktion der ROS-Bildung bereits bei einer Terbinafinkonzentration von 10 µg/ml nachgewiesen ( $p < 0,05$ ). Diese Konzentration ist mit der therapeutischen Dosierung von 0,01 mg/ml (1 %) Terbinafin in topischen Zubereitungen vergleichbar (Ryder und Favre 1997). Das Ausmaß der ROS-Reduktion stieg in der maximalen Terbinafinkonzentration von 100 µg/ml von 24 % nach 10 min Inkubationszeit auf 41 % nach 60 min Inkubationszeit.

Die Zeitabhängigkeit der terbinafininduzierten ROS-Hemmung legt die Vermutung nahe, daß es neben radikalfangenden Mechanismen auch eine Interaktion bei der Bildung von Radikalen gibt. Die ausgeprägte Zunahme der ROS-Reduktion nach 60 min läßt eine Hemmung des Entstehungsprozesses reaktiver Sauerstoffspezies vermuten. Terbinafin könnte neben der Wachstumshemmung auch über diesen Mechanismus seine antimykotische und antiinflammatorische Wirkung entfalten.

#### 4.4. ROS-Bildung und Virulenz

Um den Zusammenhang zwischen Hyphenbildung, Pathogenität und ROS-Bildung stärker zu verdeutlichen, wurden der virulente hyphenbildende Stamm CA6 und seine avirulente agerminative Mutante VIR3 untersucht.

In der Blastosporenphase konnte bei beiden Stämmen eine konzentrationsabhängige ROS-Bildung mit einem Maximum für  $1 \times 10^8$  Zellen/ml nachgewiesen werden. Die ROS-Bildung war durch den virulenten Stamm bei den Zellzahlen  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$  Zellen/ml signifikant höher ( $p < 0,05$ ). Bei beiden Stämmen war für eine Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml ein starker Rückgang der Radikalbildung nachweisbar.

Unter hypheninduzierenden Bedingungen bildete nur der virulente Stamm CA6 Hyphen, wobei dieser Prozeß schneller als bei dem Stamm 3153A verlief. Bei der avirulenten und agerminativen Mutante VIR3 waren keine morphologischen Veränderungen nachweisbar. Nach 30 min unter hypheninduzierenden Bedingungen war zunächst ein Anstieg der ROS-Bildung bei beiden Stämmen meßbar, wobei der virulente Stamm signifikant höhere Werte

aufwies ( $p < 0,001$ ). Nach 60 min war bei beiden Stämmen ein Rückgang der Radikalbildung nachweisbar. Die Werte des virulenten Stammes CA6 lagen unter denen von VIR3. Allerdings hatte CA6 zu diesem Zeitpunkt lange Hyphen ausgebildet. Wie in einigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist ein wesentlicher Aspekt bei der Pathogenitätssteigerung von *Candida albicans* die Keimschlauchbildung, die den Beginn der Hyphenphase markiert (Vatavarian 1992, Borg und Röchel 1988). Wenn Hyphen eine bestimmte Länge erreichen, ist der oxidative Metabolismus der Zellen gehemmt (Aoki und Ito-Kuwa 1982). Der Filamentationsprozeß ist mit der Pathogenität von *Candida albicans* assoziiert, da die physische Ausstülpung eines Keimschlauches die Ausbreitung des Pilzes in Gewebe erlaubt und das Verbleiben in phagozytierenden Zellen verhindert (Danley et al. 1983).

Die gesteigerte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies von *Candida-albicans*-Zellen könnte die Invasion in Wirtsgewebe verstärken, da ROS zytotoxisch für Säugetierzellen aber auch Mikroorganismen sind. *Candida albicans* verfügt über antioxidative Enzyme, die im Zytosol lokalisiert sind und die Zelle vor einem Übermaß an reaktiven Sauerstoffspezies schützen (Romandini et al. 1994, Tosado-Acevedo et al. 1992). Sowohl eine Catalase-Aktivität als auch das Vorhandensein von Superoxiddismutase wurden bei *Candida albicans* beschrieben (Gunasekaran et al. 1998, Wysong et al. 1998). Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle beim Erhalt des oxidativen Gleichgewichtes und der biologischen Integrität innerhalb der Zelle.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von *Candida albicans* wesentlich durch die morphologische Form beeinflusst wird. Die ROS-Bildung könnte eine wichtige Rolle bei der Invasion von Hyphen in Wirtsgewebe spielen. Wie anhand des Vergleiches von virulentem, hyphenbildendem Stamm und seiner avirulenten, agerminativen Mutante gezeigt werden konnte, ist die Fähigkeit zu Hyphenbildung mit einer erhöhten ROS-Bildung assoziiert. Diese Ergebnisse könnten dazu beitragen, ein besseres Verständnis für die Überlegenheit der Hyphenform bei der Gewebsinvasion zu entwickeln.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit von *Candida albicans* untersucht, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden. Dabei wurde erstmals auf den Einfluß der verschiedenen morphologischen Formen eingegangen. Diesen kommt bei der Pathophysiologie von *Candida-albicans*-Infektionen eine entscheidende Bedeutung aufgrund der invasiven Eigenschaften der Hyphenform zu.

Anhand der Untersuchungen mit dem humanpathogenen *Candida-albicans*-Stamm 3153A konnte gezeigt werden, daß eine Konzentrationsabhängigkeit der ROS-Bildung in der Blastosporenphase vorliegt. Das Maximum der ROS-Bildung zeigte sich für  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Diese Zellzahl besitzt *in vivo* eine hohe Pathogenität. Die verschiedenen Kulturmedien hatten einen großen Einfluß auf den Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies. So konnte die maximale ROS-Bildung bei Messungen in glukosefreien Medien nachgewiesen werden. Ein Mangel an Nährstoffen scheint zu einer Verstärkung der ROS-Bildung zu führen. Im morphologischen Vergleich von Blastosporen, Zellen mit Keimschlauchbildung und Hyphen konnten signifikante Unterschiede in der Bildung von ROS aufgezeigt werden. Zellen mit Keimschläuchen bildeten bereits signifikant mehr ROS als Blastosporen. In der Hyphenphase war ein weiterer signifikanter Anstieg nachweisbar. Diese Ergebnisse ließen sich sowohl in PBS als auch in YEPG-Kulturmedium zeigen. Mit den beiden verwendeten Methoden, der Chemilumineszenzmessung und dem Cytochrom c Assay, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Eine positive Korrelation beider Methoden konnte sowohl für die Blastosporenversuche als auch für den morphologischen Vergleich nachgewiesen werden. Beide Methoden sind geeignet für den Nachweis der ROS-Bildung von *Candida albicans*. Für die Chemilumineszenzmessung konnten aber deutliche Vorteile in der Meßdauer, im Probenvolumen sowie in der Probenanzahl, der Kinetik und der Genauigkeit beobachtet werden.

Der Einfluß des Antimykotikums und Radikalfängers Terbinafin auf die ROS-Bildung wurde in der Blastosporenphase untersucht. Terbinafin hemmt dosis- und zeitabhängig die Produktion von ROS. Die Substanz könnte neben der Wachstumshemmung auch über diesen Mechanismus seine antimykotische und antiinflammatorische Wirkung entfalten.

Um den Zusammenhang zwischen Hyphenbildung, Pathogenität und ROS-Bildung stärker zu verdeutlichen, wurden der virulente hyphenbildende Stamm CA6 und seine avirulente agerminative Mutante VIR3 untersucht. In der Blastosporenphase konnte bei beiden Stämmen eine konzentrationsabhängige ROS-Bildung mit einem Maximum für  $1 \times 10^8$  Zellen/ml nachgewiesen werden. Die ROS-Bildung war bei dem virulenten Stamm signifikant höher. Unter hypheninduzierenden Bedingungen bildete nur der virulente Stamm CA6 Hyphen, wobei dieser morphologische Prozeß schneller als bei dem Stamm 3153A verlief. Bei dem avirulenten und agerminativen Stamm VIR3 waren keine morphologischen Veränderungen nachweisbar. Nach 30 min unter hypheninduzierenden Bedingungen war zunächst ein Anstieg der ROS-Bildung bei beiden Stämmen meßbar, wobei der virulente Stamm signifikant höhere Werte aufwies. Nach 60 min war bei beiden Stämmen ein Rückgang der Radikalbildung nachweisbar. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Keimschlauchbildung als Beginn des Hyphenwachstums der entscheidende Faktor für das Ausmaß der ROS-Bildung ist. Wenn die Hyphen eine bestimmte Länge erreicht haben, wird die Atmungsaktivität der Zelle vermindert.

In dieser Arbeit wird erstmals die ROS-Bildung verschiedener morphologischer Formen von *Candida albicans* untersucht. Die Hyphenbildung, die als einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *Candida albicans* angesehen wird, ist mit einer signifikant erhöhten ROS-Bildung assoziiert. Die ROS-Bildung ist nicht ausschließlich an die Fähigkeit zur Hyphenbildung gebunden, die Bildung von Radikalen ist aber am ausgeprägtesten in germinativen Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß die ROS-Bildung besonders in der Hyphenphase zur Invasion in Wirtsgewebe und zum Fortschreiten der Entzündungsreaktion beitragen könnte. Möglichkeiten zur therapeutischen Beeinflussung der ROS-Bildung scheint es darüber hinaus durch den Einsatz von Allylamin-Antimykotika zu geben. In weiterführenden Studien sollte daher die ROS-Bildung von *Candida albicans* im Zusammenhang mit Einflußvariablen des Wirtsorganismus untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. AFANASEV IB, OSTRACHOVITCH EA, KORKINA LG (1999)  
Lucigenin is a mediator of cytochrome c reduction but not of superoxide production.  
Arch Biochem Biophys 366: 267-74.
2. ALBRECHT S, ZIMMERMANN T, BRANDL H, SAEGER HD, DISTLER W (1997)  
Chemilumineszenz am Rande der Jahrtausendwende.  
J Lab Med 21: 191-204.
3. AOKI S, ITO-KUWA S (1982)  
Respiration of *Candida albicans* in relation to its morphogenesis.  
Plant Cell Physiol 23: 721-726.
4. AZZI A, MONTECUCCO C, RICHTER C (1975)  
The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals  
produced in biological membranes.  
Biochem Biophys Res Commun 65: 597-603.
5. BEAUSEJOUR A, GRENIER D, GOULET JP, DESLAURIERS N (1998)  
Proteolytic activation of the interleukin-1 $\beta$  precursor by *Candida albicans*.  
Infect Immun 66: 676-681.
6. BIBEL DJ, ALY R, SHAH S, SHINEFIELD HR (1993)  
Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin.  
Acta Dermato Venerol 73: 407-411.
7. BODEY G (1993)  
Candidiasis: pathogenesis, diagnosis, and treatment.  
2. Edition. Raven Press: New York.
8. BORG M, RÜCHEL R (1988)  
Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida ssp.* during  
experimental infection of oral mucosa.  
Infect Immun 56: 626-631.



9. BORG VON ZEPELIN M, SCHUFF-WERNER P (1992)  
Chemiluminescence of polymorphonuclear granulocytes in the presence of selected *Candida* species.  
Mycoses 32: 121-129.
10. BORGERS M, DE NOLLIN S, THONÉ F, VAN BELLE H (1977)  
Cytochemical localization of NADH oxidase in *Candida albicans*.  
J Histochem Cytochem 25: 193-199.
11. BOVERIS A (1978)  
Production of superoxide anion and hydrogen peroxide in yeast mitochondria.  
In BACILA M, HORECKER BL, STOPPANI AOM (EDS.)  
Biochemistry and genetics of yeast.  
Academic Press, New York. S. 65-79.
12. BRAMANO K, TSUBOI R, MURAI M, MIYAKAWA Y, FUKAZAWA Y, OGAWA H (1994)  
Scanning electron microscope observation of adherence of *Candida albicans* to cultured keratinocytes.  
J Med Vet Mycology 32: 473-476.
13. CALDERONE RA, BRAUN PC (1991)  
Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*.  
Microbiol Rev 55: 1-10.
14. CAMERA E, CANNISTRACI C, BRIGANTI S, COLOMBO D, PICARDO M (1999)  
Scavenging effects of terbinafine on free radicals in vitro.  
Br J Dermatol 140: 640-644.
15. CARLSON E, JOHNSON G (1985)  
Protection by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus* in the establishment of dual infection in mice.  
Infect Immun 50: 655-659.
16. CASANOVA M, CERVERA AM, GOZALBO D, MARTINEZ JP (1997)  
Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*.  
Infect Immun 65: 4360-4364.
17. CORNER BE, MAGEE PT (1997)  
*Candida* pathogenesis: Unravelling the treads of infection. Curr Biol 7: R691-694.

18. CRITCHLEY IA, DOUGLAS LJ (1987)  
Role of glycosides as epithelial receptors for *Candida albicans*.  
J Gen Microbiol 133: 637-643.
19. CSATO M, BOZOKY B, HUNYADI H, DOBOZY A (1986)  
*Candida albicans* phagocytosis by separated human epidermal cells.  
Arch Dermatol Res 279:136-139.
20. CURNUTTE JT, KIPNES RS, BABIOR BM (1975)  
Defect in pyridine nucleotide dependent superoxide production by a particulate fraction from the granulocytes of patients with chronic granulomatous disease.  
N Engl J Med 293: 628-32.
21. CUTLER JE (1991)  
Putative virulence factors of *Candida albicans*.  
Annu Rev Microbiol 45: 187-218.
22. DANLEY DL, HILGER AE, WINKEL CA (1983)  
Generation of hydrogen peroxide by *Candida albicans* and influence on murine polymorphonuclear leukocyte activity.  
Infect Immun 40: 97-102.
23. DANLEY DL, POLAKOFF J (1986)  
Rapid killing of monocytes *in vitro* by *Candida albicans* yeast cells.  
Infect Immun 51: 301-313.
24. DASTIDAR SG (1966)  
Studies on nucleic acids and protein contents of *Candida albicans* and their relationship to dimorphism.  
Ind J Exp Biol Med 4: 51-52.
25. DE NOLLIN S, THONÉ F, BORGERS M (1975)  
Enzyme cytochemistry of *Candida albicans*.  
J Histochem Cytochem 23: 758-765.
26. DELICONSTANTINOS G, VILLIOTOU V, STAVRIDES JC (1997)  
Inhibition of ultraviolet B-induced skin erythema by N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine.  
J Derm Sci 15: 23-35.

27. DIGUISEPPI J, FRIDOVICH I (1980)  
Ethylene from 2-keto-4-thiomethyl butyric acid: the Haber-Weiss reaction.  
Arch Biochem Biophys 205: 323-329.
28. DOUGLAS LJ (1988)  
*Candida* proteinases and candidosis.  
CRC Crit Rev Biotechnol 8: 121-129.
29. EL-MAGHRABI EA, DIXON DM, BURNETT JW (1990)  
Characterization of *Candida albicans* epidermolytic proteases and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes.  
Clin Exp Dermatol 15: 183-191.
30. EPSTEIN JB, KIMURA LH, MENARD TW, TRUELOVE EL, PEARSALL NN (1982)  
Effect of specific antibodies on the interaction between fungus *Candida albicans* and human oral mucosa.  
Arch Oral Biol 27: 469-474.
31. EREMINA SS, LOZINOV AB (1981)  
Hydrogen peroxide release into medium by growing and resting yeast cells.  
Mikrobiologiya 50: 414-417.
32. EVANS EGV, JAMES IGV, SEAMAN RAJ, RICHARDSON MD (1993)  
Does naftitine have anti-inflammatory properties?  
Br J Dermatol 129: 437-442.
33. EVANS EGV, ODDS FC, RICHARDSON MD, HOLLAND KT (1975)  
Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*.  
Can J Microbiol 21: 338-342.
34. FAVRE B, RYDER NS (1997)  
Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*.  
Gene 189: 119-126.
35. FILLER SG, PFUNDER AS, SPELLBERG BJ, EDWARDS JE JR (1996)  
*Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells.  
Infect Immun 64: 2609-2617.

36. FILLER SG, SWERDLOFF JN, HOBBS C, LUCKETT PM (1995)  
Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*.  
*Infect Immun* 63: 976-983.
37. FRATTI RA, BELANGER PH, GHANNOUM MA, EDWARDS JE JR, FILLER SG (1998)  
Endothelial cell injury caused by *Candida albicans* is dependent on iron.  
*Infect Immun* 66: 191-196.
38. FREY C, BARONE J, DRUTZ DJ (1990)  
Role of the *Candida albicans* iC3b receptor in fungal adherence to endothelial cells  
In: Program and Abstracts of the 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for  
Microbiology. American Society for Microbiology: Washington, DC. Abstract Nr.  
101.
39. FRIDOVICH I (1984)  
Overview: Biological Sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup>.  
*Meth Enzymol* 105: 59-61.
40. GALUTZOV B, GANEVA V (1997)  
Lucigenin-derived chemiluminescence in *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Bioelectrochem Bioenerget* 44: 77-82.
41. GARNER RE, CHILDRESS AM, HUMAN LG, DOMER JE (1990)  
Characterisation of *Candida albicans* mannan-induced, mannan-specific delayed  
hypersensitivity suppressor cells.  
*Infect Immun* 58: 2613-2620.
42. GEORGOPAPADAKOU NH, BERTASSO A (1992)  
Effects of squalene epoxidase inhibitors on *Candida albicans*.  
*Antimicrob Agents Chemother* 36: 1779-1781.
43. GHANNOUM MA (1988)  
Mechanisms potentiating *Candida* infections.  
*Mycoses* 31: 543-557.
44. GHANNOUM MA, ABU-ELTEEN KH (1990)  
Pathogenicity determinants of *Candida*.  
*Mycoses* 33: 265-282.

45. GÖTTLICHER S, MEYER H (1997)  
Vulvovaginalmykose. Klinische Ergebnisse einer epidemiologischen Langzeitstudie.  
1. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
46. GOW NA, PERERA TH, SHERWOOD-HIGHAM J (1994)  
Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic  
fungus *Candida albicans*.  
Scanning Microscopy 8: 705-710.
47. GUNASEKARAN U, YANG RP, GUNASEKARAN M (1998)  
Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Candida albicans*.  
Mycopathol 141: 59-63.
48. HAZEN KC, CUTLER JE (1979)  
Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*.  
Infect Immun 24: 661-666.
49. HIPLER UC, SCHREIBER G, WOLLINA U (1998)  
Reactive oxygen species in human semen: Investigations and measurements.  
Arch Androl 40: 67-78.
50. HIPLER UC, WOLLINA U, MAYSER P (1999)  
Chemiluminescence measurements of reactive oxygen species (ROS) generated by  
different stimulated Trichosporon strains.  
In: RODA A, PAZZAGLI M, KRICKA LJ UND STANLEY PE (EDS.).  
Bioluminescence and Chemiluminescence. Perspectives for the 21<sup>st</sup> Century.  
John Wiley & Sons, Chichester, UK: 307-310.
51. IBRAHIM AS, MIRBOD F, FILLER SG, BANNO Y, COLE GT, KITAJIMA Y, EDWARDS  
JE, NOZAWA Y, GHANNOUM MA (1995)  
Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect  
Immun 63: 1993-1998.
52. INOUE M, KOYAMA K (1994)  
In vivo determination of superoxide and vitamin c radicals using cytochrome c and  
superoxide dismutase derivatives.  
Meth Enzymol 234: 338-343.

53. JEHN U (1997)  
Klinische Mykologie: Leitfaden für die interdisziplinäre Praxis.  
1. Auflage, ecomed: Landsberg.
54. KAMINISHI H, MIYAGUCHI H, TAMAKI T (1995)  
Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase.  
Infect Immun 63: 984-988.
55. KASHIMA M, TAKAHASHI H, SHIMOZUMA M, EPSTEIN WL, FUKUYAMA K (1989)  
Candidacidal activities of proteins partially purified from rat epidermis.  
Infect Immun 57: 186-190.
56. KENNEDY MJ, CALDERONE RA, CUTLER JE (1992)  
Molecular basis of *Candida albicans* adhesion.  
J Med Vet Mycology 30: 95-122.
57. KHAN AU, KASHA M (1994)  
Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction.  
Proc Natl Acad Sci USA 91:12365-12367.
58. KILIAN M, MESTECKY J, RUSSELL MW (1988)  
Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by immunoglobulin A proteases.  
Microbiol Rev 52: 296-303.
59. KIMURA LH, PEARSALL NN (1980)  
Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells.  
Infect Immun 28: 464-468.
60. KLINGER W, KARGE E, KRETZSCHMAR M, ROST M, SCHULZE HP, DARGEL R, REINEMANN C, REIN H (1996)  
Luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence with rat liver microsomes.  
Exp Toxicol Path 48: 447-460.
61. KLOTZ SA, DRUTZ DJ, HARRISON JL, HUPPERT M (1983)  
Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida albicans*.  
Infect Immun 42: 374-384.

62. KLOTZ SA, SMITH RL, STEWART BW (1992)  
Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hepatogenous candidal infection in rabbits.  
Antimicrob Agents Chemother 36: 132-136.
63. KÖHLER JR, FINK GR (1996)  
*Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signalling components have defects in hyphal development.  
Proc Natl Acad Sci USA 93: 13223-13228.
64. KUJATH P (1998)  
Mykosen in der operativen Medizin. Grundlagen der Diagnostik und Therapie.  
1. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
65. KURTZMAN CP, FELL JW (1998)  
The yeasts, a taxonomic study.  
4. Edition, Elsevier: Amsterdam.
66. LEBERER E, ZIEGELBAUER K, SCHMIDT A, HARCUS D, DIGNARD D, ASH J, JOHNSON L, THOMAS DY (1997)  
Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCl4p.  
Curr Biol 7: 539-546.
67. LEBERER E, HARCUS D, BROADBENT ID, CLARK KL, DIGNARD D, ZIEGELBAUER K, SCHMIDT A, GOW NAR, BROWN AJP, THOMAS DY (1996)  
Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*.  
Proc Natl Acad Sci USA 93: 13217-13222.
68. LIOCHEV SL, FRIDOVICH I (1997)  
Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production.  
Arch Biochem Biophys 337: 115-120.
69. MACDONALD F, ODDS FC (1983)  
Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant.  
J Gen Microbiol 129: 431-438.

70. MACHLIN LJ, BENDICH A (1987)  
Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients.  
FASEB J 1: 441-445.
71. MACKENZIE DWR, ODDS FC (1991)  
Non-identity and authentication of two major reference strains of *Candida albicans*.  
J Med Vet Mycol 29: 255-261.
72. MAZZOLLA R, BARLUZZI R, PULITI M, SALEPPICO S, MOSCI P, BISTONI F, BLASI E  
(1996) Biomolecular events involved in the establishment of brain anticandidal  
resistance. J Neuroimmunol 64: 9-17.
73. MAZZOLLA R, BARLUZZI R, ROMANI L, MOSCI P, BISTONI F (1991)  
Anti-*Candida* resistance in the mouse brain and effect of intracerebral administration  
of interleukin 1.  
Gen Microbiol 137: 1799-1804.
74. MCCORD JM, FRIDOVICH I (1968)  
The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase.  
J Biol Chem 243: 5753-5760.
75. MCCORD JM, FRIDOVICH I (1988)  
Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988).  
Free Radic Biol Med 5: 363-369.
76. MCKINNEY KA, LEWIS SEM, THOMPSON W (1996)  
Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin  
chemiluminescent probes.  
Arch Androl 36: 119-125.
77. MINZENBERG I, FERBER E (1984)  
Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-oxidase  
activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes.  
J Immunol Meth 71: 61-67.
78. NAGLIK JR, NEWPORT G, WHITE TC, FERNANDES-NAGLIK LL, GREENSPAN JS,  
GREENSPAN D, SWEET SP, CHALLACOMBE SJ, AGABIAN N (1999)  
In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis.  
Infect Immun 67: 2482-2490.



79. NIKAWA H, NISHIMURA H, SADAMORI S (1997)  
Quantification of thigmotropism (contact sensing) of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.  
Mycopathol 138: 13-19.
80. NISHIKAWA T, TOKUNAGA S, FUSE F, TAKASHIMA M, NODA T, OHKAWA M,  
NAKAMURA S, NAMIKI M (1997)  
Experimental study of ascending *Candida albicans* pyelonephritis focusing on the  
hyphal form and oxidant injury.  
Urol Int 58: 131-136.
81. ODDS FC (1985)  
Morphogenesis in *Candida albicans*.  
CRC Crit Rev Microbiol 12: 45-93.
82. ODDS FC (1988)  
*Candida* and Candidosis.  
2. Edition, Baillière Tindall: London.
83. ODDS FC (1994)  
Pathogenesis of *Candida* infections.  
J Am Acad Dermatol 31: 2-5.
84. OKAMOTO K, ASHIMOTO A, TANAKA Y (1993)  
Germ tube formation and proteinase activity of *Candida albicans* in relation to  
virulence for mice.  
J Jap Assoc Infect Dis 67: 466-472.
85. OLLERT MW, SÖHNCHEN R, KORTING NC, OLLERT U, BRÄUTIGAM S, BRÄUTIGAM W  
(1993)  
Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal  
keratinocytes.  
Infect Immun 61: 4560-8.
86. OLLERT MW, WADSWORTH E, CALDERONE RA (1990)  
Reduced expression of the functionally active complement receptor for iC3b but not  
for C3d on an avirulent mutant of *Candida albicans*.  
Infect Immun 58: 909-13.

87. PETERS TR, TOSK JM, GOULBOURNE EA (1990)  
Lucigenin chemiluminescence as a probe for measuring reactive oxygen species production in *Escherichia Coli*.  
Anal Biochem 186: 316-319.
88. PODZORSKI RP, GRAY FR, NELSON RD (1990)  
Different effect of native *Candida albicans* mannan and mannan-derived oligosaccharides on antigen-stimulated lymphoproliferation *in vitro*.  
J Immunol 144: 707-716.
89. RADFORD DR, SWEET SP, CHALLACOMBE SJ, WALTER JD (1998)  
Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes.  
J Dent 26: 577-583.
90. ROGERS TJ, BALISH E (1980)  
Immunity to *Candida albicans*.  
Microbiol Rev 44: 660-682.
91. ROMANDINI P, BONOTTO C, BERTOLONI G, BELTRAMINI M, SALVATO B (1994)  
Superoxide dismutase, catalase and cell dimorphism in *Candida albicans* cells exposed to methanol and different temperatures.  
Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol 108: 53-57.
92. ROMANI L, MENCACCI A, TONNETTI L, SPACCAPELO R, CENCI E, WOLF S, PUCETTI P, BISTONI F (1994)  
Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis.  
Eur J Immunol 24: 909-915.
93. ROMANI L, MOCCI S, BIETTA C, LANFALONI L, PUSSETTI P, BISTONI F (1991)  
Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 and responses with acquired resistance.  
Infect Immun 59: 4647-4654.
94. RÜCHEL R (1986)  
Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*.  
Microbiol Sci 3: 316-319.

95. RÜCHEL R, BORG VON ZEPELIN, M, EIFFERT H, MUCHE R (1991)  
Bacteria accompanying clinical *Candida* isolates from respiratory secretions and the genitourinary tract.  
*Mycoses* 34: 235-238.
96. RÜCHEL R, DE BERNARDIS F, RAY TL, SULLIVAN PA, COLE GT (1992)  
*Candida* acid proteinase.  
*J Med Vet Mycology* 30 [Suppl 1]: 123-132.
97. RYDER NS (1992)  
Terbinafine: Mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition.  
*Br J Dermatol* 126 [Suppl 39]: 2-7.
98. RYDER NS, FAVRE B (1997)  
Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine.  
*Rev Contemp Pharmacother* 8: 275-386.
99. SCHERER S, MAGEE PT (1990)  
Genetics in *Candida albicans*.  
*Microbiol Rev* 54: 226-241.
100. SHEPHERD MG (1987)  
Cell envelope of *Candida albicans*.  
*CRC Crit Rev Microbiol* 15: 7-25.
101. SHEPHERD MG (1985)  
*Candida albicans*: Biology, genetics, and pathogenicity.  
*Annu Rev Microbiol* 39: 579-614.
102. SHEPHERD MG, YIN CY, RAM SP, SULLIVAN PA (1980)  
Germ tube induction in *Candida albicans*.  
*Can J Microbiol* 26: 21-26.
103. SHERWOOD J, GOW NA, GOODAY GW (1992)  
Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration.  
*J Med Vet Mycol* 30: 461-469.
104. SLATER TF (1984)  
Free-radical mechanisms in tissue injury.  
*Biochem J* 222: 1-15.

105. SMAIL EH, CRONSTEIN BN, MESHULAM T, ESPOSITO AL, RUGGER RW, DIAMOND RD (1992)  
In vitro, *Candida albicans* releases the immune modulator adenosine and a second, high-molecular weight agent that blocks neutrophil killing.  
J Immunol 148: 3588-3595.
106. SMITH PK (1985)  
Measurement of protein using bicinchoninic acid.  
Anal Biochem 150: 75-85.
107. SOBEL JD, MYERS PG, KAYE D, LEVISON ME (1981)  
Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells.  
J Infect Dis 143: 76-82.
108. SOBEL JD, MULLER G, BUCKLEY HR (1984)  
Critical role of germ-tube formation in the pathogenesis of *Candida vaginitis*.  
Infect Immun 44: 576-580.
109. SOBEL JD (1992)  
Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis.  
Clin Inf Dis 14: 148-153.
110. SOLL DR (1992)  
High-frequency switching in *Candida albicans*.  
Clin Microbiol Rev 5: 183-203.
111. SOLL DR (1995)  
A molecular approach to the role of switching in oral candidiasis.  
In: GREENSPAN JS, GREENSPAN D, (EDS.)  
Oral manifestations of HIV infection. Quintessence Publishing C.: Chicago. 93-102.
112. SOLOMON BA, LEE WL, GEEN SC (1993)  
Modification of neutrophil function by naftitine.  
Br J Dermatol 128: 393-398
113. STORCH J, FERBER E (1988)  
Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase.  
Anal Biochem 169: 262-267.

114. SULLIVAN PA, YIN CY, MOLLOY C, TEMPLETON MD, SHEPHERD MG (1983)  
An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation.  
Can J Microbiol 29: 1514-1525.
115. SWEET SP (1997)  
Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection.  
Oral Dis 3 [Suppl 1]: 88-95.
116. SWOBODA RK, BERTRAM G, BUDGE S, GOODAY GW, GOW NA, BROWN AJ (1995)  
Structure and regulation of the HSP90 gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*.  
Infect Immun 63: 4506-4514.
117. TAKAHASHI M, BANNO Y, NOZOWA Y (1991)  
Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase.  
J Med Vet Mycol 29: 193-204.
118. TOSADO-ACEVEDO R, TORANZOS GA, ALSINA A (1992)  
Extraction and purification of a catalase from *Candida albicans*.  
P R Health Sci J 11: 77-80.
119. TOYOKUNI S (1999)  
Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology.  
Pathol Int 49: 91-102.
120. VAGO T, BALDI G, COLOMBO D, BARBARESCHI M, NORBIATO G, DALLEGRI F, BEVILACQUA M (1994)  
Effects of naftifine and terbinafine, two allylamine antifungal drugs, on selected functions of human polymorphonuclear leukocytes.  
Antimicrob Agents Chemother 38: 2605-2611.
121. VARTIVARIAN SE (1992)  
Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi.  
Clin Infect Diseases 14 [Suppl 1]: 30-36.

122. VAZQUES-TORRES A, BALISH E (1997)  
Macrophages in resistance to *Candidiasis*.  
Microbiol Mol Biol Rev 61: 170-192.
123. WAGNER DK, SOHNLE PG (1995)  
Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts.  
Clin Microbiol Rev 8: 317-335.
124. WARDMAN P, CANDEIAS LP (1996)  
Fenton chemistry: an introduction.  
Radiat Res 145: 523-531.
125. WEBER H (1993)  
Allgemeine Mykologie.  
1. Auflage, Gustav Fischer Verlag: Jena, Stuttgart.
126. WHITE TC, AGABIAN N (1995)  
*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors.  
J Bacteriol 177: 5215-5221.
127. WIECHELMANN K (1988)  
Investigations of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.  
Anal Biochem 175: 231-233.
128. WILLIAMS AJ, COLE PJ (1981)  
Investigation of alveolar macrophage function using lucigenin-dependent chemiluminescence. Thorax 36: 866-869.
129. WYSONG DR, CHRISTIN L, SUGAR AM, ROBBINS PW, DIAMOND RD (1998)  
Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene.  
Infect Immun 66: 1953-1961.
130. YAMAGUCHI H (1974)  
Dimorphism in *Candida albicans*. I. Morphology-dependent changes in cellular content of macromolecules and respiratory activity.  
J Gen Appl Microbiol 20: 87-99.

131. YAMAGUCHI H, KANDA Y, IWATA K (1971)  
Biochemical Properties of Mitochondria from *Candida albicans*.  
Sabouraudia 9: 221-230.

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Zelle von *Candida albicans*, elektronenmikroskopische Aufnahme, medianer Gefrierbruchschnitt (Vergrößerung 1: 30 400). Nach Weber 1993.
- Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Candida albicans* mit Keimschlauchbildung, an Epithelzellen haftend. Nach Ghannoum et al. 1990.
- Abb. 3: Bildung von  $H_2O_2$  und  $\cdot O_2^-$  in Mitochondrien von Hefen. Darstellung der Funktion von Superoxiddismutase (SOD) und Cytochrom-c-Peroxidase (CCP). Ubisemiquinon (UQ) und Cytochrom c (Cyt c) sind Enzyme der Atmungskette. Nach Boveris 1978.
- Abb. 4: Mechanismus der fungiziden und fungistatischen Wirkung von Terbinafin. Nach Ryder 1992.
- Abb. 5: Wachstum der *Candida-albicans*-Stämme auf Sabouraud-Glukose(4 %)-Agar. Alter der Kulturen: 48 h.
- Abb. 6: Zellzahlmessung mit dem Casy-Cellcounter. Ausdruck für 24-h-Kultur, Stamm *Candida albicans* 3153A.
- Abb. 7: Wachstumskurve von Hefen mit den verschiedenen Phasen des Wachstums und dem Unterschied zwischen der totalen Zellzahl und der Anzahl der lebenden Zellen. Nach Cook 1958.
- Abb. 8: Wachstumskurve bei 24-h-Kultur, Stamm 3153A.
- Abb. 9: Morphologische Veränderungen unter hypheninduzierenden Bedingungen, Stamm 3153A. Calcofluorfärbung, Vergrößerung 1000 x.
- Abb. 10: Morphologische Veränderungen unter hypheninduzierenden Bedingungen, Stamm CA6. Calcofluorfärbung, Vergrößerung 1000 x.
- Abb. 11: Morphologische Veränderungen unter hypheninduzierenden Bedingungen, Stamm VIR3. Calcofluorfärbung, Vergrößerung 1000 x.
- Abb. 12: Proteingehalt im Verlauf einer 24-h-Kultur, Stamm 3153A.
- Abb. 13: Einfluß der steigenden Zellzahl von *Candida-albicans*-Blastosporen (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS, gemessen als lucigeninverstärkte Chemilumineszenz in verschiedenen Medien (PBS und YEPG).



- Abb. 14: Einfluß von verschiedenen morphologischen Formen bei *Candida albicans* (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS, gemessen als Chemilumineszenz in verschiedenen Medien.
- Abb. 15: Einfluß von steigender Blastosporenzahl (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS. Cytochrom-c-Assay in verschiedenen Medien (PBS und KRPG).
- Abb. 16: Einfluß verschiedener morphologischer Formen bei *Candida albicans* (Stamm 3153A) auf die Bildung von ROS. Cytochrom c Assay in verschiedenen Medien.
- Abb. 17: Konzentrationsabhängige Hemmung der ROS-Bildung nach 10-minütiger Inkubation mit Terbinafin. Stamm 3153A.
- Abb. 18: Konzentrationsabhängige Hemmung der ROS-Bildung nach 60-minütiger Inkubation mit Terbinafin. Stamm 3153A.
- Abb. 19: Vergleich der ROS-Bildung von Blastosporen des virulenten Stammes CA6 und seiner avirulenten und agerminativen Mutante VIR3. Chemilumineszenzmessungen in PBS-Medium.
- Abb. 20: Vergleich der ROS-Bildung von CA6 und VIR3 unter hypheninduzierenden Bedingungen. Messung als Chemilumineszenz in PBS-Medium.

## 8. Anhang

### 8.1. Danksagung

Ich möchte mich für die hervorragende Unterstützung bedanken, die ich von allen erfahren habe, die am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren.

Herrn Prof. Dr. Uwe Wollina danke ich für die Überlassung des Themas. Seine konsequente Betreuung und stetige Ermutigung in allen Phasen waren beispielhaft und ließen mich mit Freude an diesem Thema arbeiten. Frau Dr. Christina Hipler betreute die Durchführung der Experimente mit viel Engagement. Ihr danke ich auch für Hilfe und Unterstützung bei der Auswertung und Präsentation dieser Arbeit. Herr Dr. Axel Wilmer war als Mentor stets für Fragen offen und gab viele konstruktive Anregungen. Mein besonderer Dank gilt Frau Brunhilde Knöll, die mich in die verschiedenen Methoden eingearbeitet hat und bei neuen Problemen immer mit Erfahrung und Engagement unterstützt hat.

Herrn Professor Dr. Waldemar Künkel danke ich für die gute Zusammenarbeit mit der Abteilung Mykologie des Hans-Knöll-Institutes. Er stellte die bei diesen Untersuchungen verwendeten Stämme und die Methode der Hypheninduktion zur Verfügung. Frau Monika Ngyen danke ich herzlich für die Einarbeitung in die Methoden der Flüssigkultur und Hypheninduktion sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der Virulenzuntersuchungen und Fotodokumentation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Olaf Sander für seine großartige Unterstützung. Er hat mit seinem Verständnis, seinen Anregungen und seiner Kritik den Arbeitsprozeß entscheidend befördert.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre große Anteilnahme. Ihr Lob und ihre selbstverständliche Hilfe waren stets eine große Motivation.

## 8.2. *Ehrenwörtliche Erklärung*

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr Prof. Dr. U. Wollina, Frau Dr. U.-Ch. Hipler, Herr Dr. A. Wilmer, Herr Prof. Dr. W. Künkel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 10.04.01

### 8.3. *Lebenslauf*

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| Name          | Christina Sander, geb. Schröter |
| Geburtsdatum  | 04.11.1974                      |
| Geburtsort    | Jena                            |
| Familienstand | verheiratet                     |
| Nationalität  | deutsch                         |

#### *Ausbildung*

|                 |   |
|-----------------|---|
| 09/1981-09/1993 | POS, Gymnasium Adolf Reichwein Jena   |
| 09/1993         | Abitur  |
| 10/1993-04/2000 | Studium der Humanmedizin,<br>Friedrich-Schiller-Universität Jena  |
| 08/1995         | Physikum  |
| 03/1997         | Erstes Staatsexamen   |
| 03/1999         | Zweites Staatsexamen  |
| 04/1999-03/2000 | Praktisches Jahr<br>Chirurgie: Kinderchirurgie, FSU Jena<br>Innere Medizin: Chase Farm Hospital, London-Enfield, U. K.<br>Dermatologie: Klinik für Dermatologie, FSU Jena |
| 26.04.2000      | Drittes Staatsexamen, Abschluß des Studiums   |
| seit 01.05.2000 | Arzt im Praktikum an der Klinik für Dermatologie, FSU Jena  |

Jena, den 10.04.01