

# 1. Einleitung

## 1.1 *Candida albicans*

Über keinen humanpathogenen Pilz wurde in der medizinisch/ wissenschaftlichen Literatur mehr geschrieben und publiziert als über *Candida albicans*.<sup>1</sup> Als fakultativ pathogener Pilz siedelt sich *C. albicans* auf Haut und Schleimhäuten des Menschen als Teil der mikrobiellen Flora an, ohne Infektionen hervorzurufen. Treten Störungen in Abwehrmechanismen auf, kann die direkte Folge eine lokale oder systemische Erkrankung mit leichtem bis sogar tödlichem Verlauf sein. Heute spielt *C. albicans* als Pathogen vor allem bei immunsupprimierten Patienten eine wichtige Rolle. Im Folgenden soll der Pilz *C. albicans* genauer vorgestellt und die Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* näher erläutert werden.

### 1.1.1 Humanpathogene Pilze der Gattung *Candida*

Der Gattung *Candida*, welche taxonomisch dem Stamm der Ascomycota und der Familie der *Candidaceae* angehört, werden in etwa 155 Arten zugeordnet. Der größte Teil dieser Arten (~ 65%) ist zu einem Wachstum bei 37°C nicht befähigt, was eine essentielle Voraussetzung für die Interaktion mit dem menschlichen Organismus darstellt (Schauer and Hanschke, 1999). Pilze der Gattung *Candida* sind fakultativ pathogene Erreger, d.h., bei gesunden Menschen stellen sie einen harmlosen Teil der mikrobiellen Flora dar. Derzeit sind etwa 13 fakultativ humanpathogene *Candida* Arten beschrieben, wobei *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. dubliniensis* zu den medizinisch wichtigeren gehören und *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. utilis* und *C. viswanathii* medizinisch eine untergeordnete Rolle spielen. Die prozentuale Repräsentation der jeweilige *Candida* Art in einer Mikroflora hängt sehr stark von endogenen (z.B. Alter, Ernährung, Körperregion) und exogenen (geographische Lage) Faktoren ab (Ellepola and Samaranayake, 2000). Epidemiologische Daten über die Verbreitung von verschiedenen *Candida*

---

<sup>1</sup> November 2006: Einträge in PubMed: 19641 (*C. albicans*), 8051 (*C. neoformans*) und 5145 (*A. fumigatus*)

Spezies wurden in der Vergangenheit durch ungenügende diagnostische Verfahren erschwert. Die diagnostischen Möglichkeiten haben sich in den letzten Jahren jedoch weiterentwickelt, so dass eine immer genauere Bestimmung der oftmals sehr schwer voneinander zu unterscheidenden Arten möglich ist.

### 1.1.2 Wachstum und Genetik von *C. albicans*

*In vitro* handelt es sich bei *C. albicans* um einen anspruchslosen und leicht zu kultivierenden Pilz. Angepasst an ein breites pH Spektrum *in vivo* (pH 4,5 auf Vaginalschleimhäuten, pH 7,4 im Blut) zeigt *C. albicans* Wachstum in pH Bereichen von 2,5-10 und bei Temperaturen von 5°C-46°C (Odds, 1988; Hubbard *et al.*, 1986). Das Wachstum von *C. albicans* ist durch Polymorphie charakterisiert: Bei der Hefeform handelt es sich um eine ovale bis runde Zelle die sich durch Knospung von der Mutterzelle abtrennt. Werden die Zellen bestimmten Stimuli ausgesetzt, kann es zur Hyphenbildung (filamentöse Wachstumsform), zur Ausbildung von Pseudomyzel (filamentöse Mischform) oder der Ausbildung von Chlamyosporen (sporenähnliche Form) kommen. Während die Ausbildung der Hyphen und der Pseudohyphen eine wichtige Komponente für die Virulenz ist, ist die biologische Funktion der Chlamyosporen unbekannt.

Bei *C. albicans* handelt es sich um einen diploiden Pilz ohne sexuellen Zyklus. Die Sequenzierung des Genoms von *C. albicans* erfolgte erstmalig 1998 durch das "Stanford Genome Technology Center" mit der Unterstützung des „Burroughs Wellcome Fund“. Dabei wurde ein klinisches Isolat von *C. albicans* (Stamm SC5314) verwendet, das heute in den meisten Laboratorien verwendet wird. Die Annotierung der *C. albicans* Gene basierte auf Sequenzvergleichen mit dem bereits sequenzierten Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Gene ohne homologe Sequenzen in *S. cerevisiae* wurde als „IPF“ (*individual protein file*) bezeichnet. Der häufigste Karyotyp bei *C. albicans* (ca. 70% der klinischen Isolate) beinhaltet haploid 8 Chromosomen (1-7, R) (Magee *et al.*, 1992). Chromosom R ist dabei mit 3,2 Mb das größte Chromosom und beinhaltet vor allem ribosomale DNA (rDNA). Die Gesamtgröße des Genoms beträgt haploid etwa 14,8 Mb (Jones *et al.*, 2004).

Eine weitere genetische Besonderheit bei *C. albicans* besteht in einem vom universellen genetischen Code abweichenden Kodon-Gebrauch (*codon usage*).

Bei der Translation wird in *C. albicans* die tRNA<sub>CAG</sub> statt mit der Aminosäure Leucin mit der Aminosäure Serin beladen (Santos *et al.*, 1993). Die Diploidie und die ungewöhnliche *codon usage* von *C. albicans* stellt eine Herausforderung für molekularbiologische Arbeiten dar und muss z.B. bei der Herstellung von Mutanten und Expression von *C. albicans* Proteinen in anderen Organismen berücksichtigt werden.

## 1.2 Klinik von *C. albicans* Infektionen

*C. albicans* kann aus nahezu allen Körperregionen isoliert werden, was die perfekte Anpassung des Pilzes an „seinen“ Wirt verdeutlicht. Ist die Immunabwehr eingeschränkt oder die lokale Mikroflora beschädigt, kann es zu lokalen bis hin zu systemischen (invasiven) Infektionen mit leichten bis schweren klinischen Verläufen kommen. Prädisponierende Wirtsfaktoren reichen von physiologischen (Alter, Mangelernährung), immunologischen (HIV-Infektion), hämatologischen (Leukämie) und hormonellen (Schwangerschaft) zu traumatischen (Verletzungen) und iatrogenen (Katheter, Chemotherapie, Antibiotika-Therapie) Faktoren.

### 1.2.1 Orale *C. albicans* Infektionen

Die menschliche Mundhöhle besiedelt eine artenreiche Mikroflora, die aus unterschiedlichen Bakterien und Pilzen besteht. Unter den verschiedenen bakteriellen Taxa befinden sich z.B. Gattungen der Familien der *Neisseriaceae*, *Pseudomonaceae* und *Enterobacteriaceae*, die ein natürliches Gegengewicht zu einigen Hefen bilden, welche sich ebenfalls aus der Mundhöhle isolieren lassen. Bei der Mehrzahl der Hefen handelt es sich um *Candida ssp.*, wobei die häufigste Spezies *C. albicans* ist.

Der Begriff der „oralen Candidose“<sup>2</sup> steht für Erkrankungen mit klinischen Zeichen und Symptomen die hauptsächlich durch *C. albicans*, aber auch durch andere Spezies hervorgerufen werden. Orale *Candida* Infektionen zählen nach wie vor zu den häufigsten opportunistischen Infektionen, von der vor allem ältere Menschen

---

<sup>2</sup>Die Begriffe „Candidose“ und „Candidiasis“ werden in europäischen Sprachgebrauch gleichwertig verwendet, im anglo-amerikanischen Sprachgebrauch wird vorwiegend der Begriff „Candidiasis“ gebraucht.

und HIV<sup>+</sup> Patienten (mit HIV infizierte Patienten) betroffen sind. Basierend auf mangelnder Mundhygiene, schlechter Ernährung sowie Infektionen im Mundbereich (bei älteren Personen) oder einem geschwächten Immunsystem (bei HIV<sup>+</sup> Patienten), kann es zu einer unkontrollierten Vermehrung der Hefen kommen. Insgesamt zeigen 50-60% der Bevölkerung eine asymptomatische *C. albicans* Besiedelung in der Mundhöhle (Glick and Siegel, 1999). Bei HIV<sup>+</sup> Patienten liegt die asymptomatische und symptomatische Besiedelungsrate deutlich höher. Mehr als 70% der HIV<sup>+</sup> Patienten sind in der Mundhöhle asymptomatisch mit *C. albicans* besiedelt, 50-95% alle HIV<sup>+</sup> Patienten erleiden eine orale *Candida* Infektion während des Krankheitsverlaufs (Fidel, 2006; Rabeneck *et al.*, 1993). Orale Infektion mit *C. albicans* äußern sich in verschiedenen Erscheinungsformen, die sich in Klassifikationen<sup>3</sup> zusammenfassen lassen. Generell unterscheidet man in die primäre Form, die auf orale und periorale Bereiche beschränkt ist (pseudomembranöse und hyperplastische Candidose, sowie andere *C. albicans* assoziierte Veränderungen) und einer sekundären Form, die als Folge systemischer Erkrankungen auftritt und auf Haut und Schleimhäute ausgedehnt ist.

Eine Manifestation der primären oralen Candidose ist die akute *Pseudomembranöse* Candidose (*Thrush*) welche durch weiße, pseudomembranöse Plaques auf der Mundschleimhaut, dem harten und weichen Gaumen, auf der Zunge oder im weichen Rachenbereich charakterisiert ist (Abbildung 1). Die Plaques lassen sich durch einen Abstrich entfernen und hinterlassen eine erodierte Oberfläche. Prädisponierende Faktoren können systemische Ursachen wie eine HIV<sup>+</sup> Infektion, Leukämie, Drogenmissbrauch oder lang anhaltende Antibiotika-Therapien sein. Bei HIV<sup>+</sup> Patienten ist diese Form der Candidose weit verbreitet, und sehr häufig ist eine orale Candidose unklarer Genese eines der ersten Zeichen für eine HIV-Infektion.

Die chronische *hyperplastische* Candidose ist gekennzeichnet durch weiße, homogene Läsionen, welche sich nicht durch Abstriche entfernen lassen. Betroffen sind die Mundschleimhaut, der Gaumen sowie seitliche Bereiche der

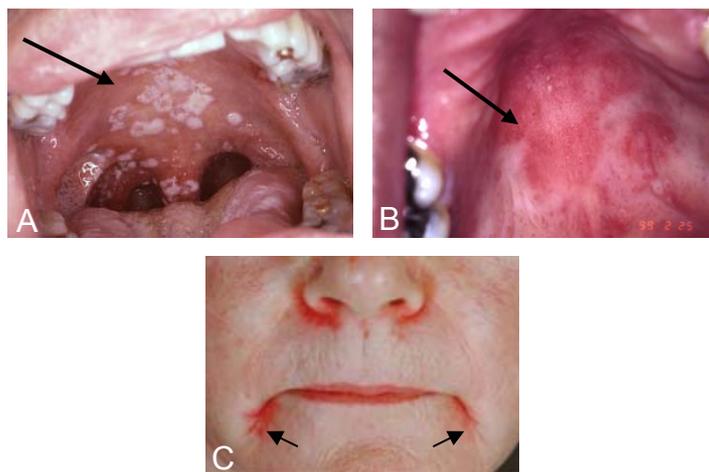
---

<sup>3</sup>Die heute verwendete Klassifikation der oralen Candidose basiert auf einer Reklassifikation von T. Axell (Axell *et al.*, 1997) nach der bis 1997 verwendeten Klassifikation von T. Lehner (Lehner *et al.*, 1967) die z.B. die Ausbreitung der oralen Candidose in HIV<sup>+</sup> Patienten noch nicht berücksichtigte.

Zunge. Begünstigende Faktoren für diese Form sind lokale Faktoren wie Rauchen, Xerostomia (trockener Mund), so wie auch geographische und ethnische Faktoren (Sitheeque and Samaranayake, 2003). Die *Prothesenstomatitis* sowie *Chelitis angularis* u.a werden unter „*Candida albicans* assoziierte Veränderungen“ zusammengefasst. Bei der *Prothesenstomatitis* bilden sich Läsionen unter den von Mundprothesen bedeckten weichen Teilen des Gaumen oder des Kiefers. Auch die *Chelitis angularis* betrifft vor allem ältere Menschen oder Mundprothesen- und Gebisssträger. Betroffen sind hier die äußeren und inneren Mundwinkel. Der Verlauf dieser Infektion wird oft durch Eisenmangel und Vitamin B12 Mangel negativ beeinflusst (McCullough and Savage, 2005; Akpan and Morgan, 2002).

Sekundäre orale Candidosen treten vor allem bei schweren systemischen Erkrankungen (z.B. Endokrinopathien, Thymus-Aplasien, AIDS) als opportunistische Erkrankungen auf (Sitheeque and Samaranayake, 2003).

In der oralen Candidose spielen nicht-*albicans* Arten nach wie vor eine untergeordnete Rolle (0-33%). Zwar werden *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* oder *C. parapsilosis* regelmäßig aus Infektionen isoliert, aber nie alleine und ohne die dominierende Präsenz von *C. albicans* (Ruhnke, 2006; Krcmery and Barnes, 2002).



#### **Abbildung 1. Primäre orale Candidosen**

In der Abbildung sind verschiedenen Manifestationen der primären oralen Candidose dargestellt: *Pseudomembranöse* Candidose (A), *hyperplastische* Candidose (B) und *Chelitis angularis* (C).

(Quelle: HIVdent.org)

### 1.2.2 Vaginale *C. albicans* Infektionen

Eine weitere Form der mukokutanen *Candidose* ist die vaginale Candidose. Obwohl *C. albicans* nach wie vor am häufigsten als der verantwortliche Keim für eine vaginale Candidose identifiziert wird, spielen andere Spezies wie *C. glabrata* und *C. tropicalis* eine immer wichtigere Rolle (Ringdahl, 2000). Mehr als 75% aller Frauen erleiden eine Episode einer vaginalen Candidose. Bei 40-50% der Frauen kommt es zu 2-4 weiteren Episoden, jedoch nur 5% leiden unter einer chronischen Form der vaginalen Candidose (Moreira and Paula, 2006; Nyirjesy, 2001; Ringdahl, 2000). Während nicht-chronisch auftretende Episoden vaginaler Candidosen häufig auf lokale Irritationen (z.B. zu enge oder schlecht belüftete Unterwäsche) oder temporäre Veränderungen (Verhütungsmittel, schlechte Ernährung, Antibiotika) zurückzuführen sind, liegen bei chronischen Verlaufsformen (> 4 Episoden /Jahr), ähnlich wie bei der oralen Candidose, sehr oft systemische Erkrankungen vor (z.B. AIDS, Diabetes mellitus) (Ringdahl, 2000).

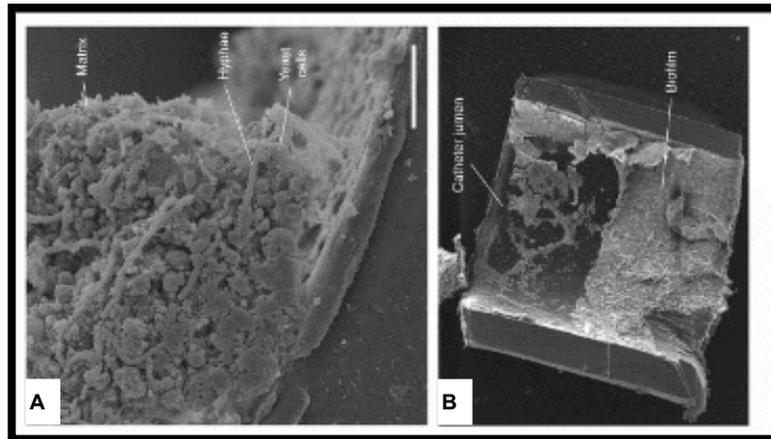
### 1.2.3 Systemische *C. albicans* Infektionen

Infektionen durch *Candida* Arten können, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, als oberflächliche Infektionen auftreten, oder in einer invasiv / systemischen Manifestation. Diese disseminierte Form der Candidose kann als Fungämie mit oder ohne Organbeteiligung auftreten, wobei häufig betroffene Organe Leber, Milz, Niere und Lunge sind. Aufgrund der vorhandenen Grundbesiedelung als Bestandteil der natürlichen Mikroflora, handelt es sich bei invasiven Candidosen sehr häufig um endogene Infektionen. Als Risikofaktoren für eine invasive Candidose werden z.B. der Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika, Glucocorticoiden, Dauerkatheter, Aufenthalte auf der Intensivstation oder wiederholte Bluttransfusionen betrachtet. Besonders abwehrgeschwächte Patienten (z.B. nach Organtransplantationen, Patienten mit fortgeschrittener HIV<sup>+</sup> Infektion, stark untergewichtige Säuglinge) stellen hier eine Hochrisikogruppe mit einer Mortalitätsrate von bis zu 40% dar (Mavor *et al.*, 2005; Ruhnke and Rosseau, 2004). Eine weitere wichtige Quelle für persistierende Candidämien (Nachweis der Pilze im Blut) basiert auf der Eigenschaft von *Candida*- Spezies Biofilme auf Kunststoffmaterialien (z.B. Kathetern) bilden zu können.

Obwohl die orale Candidose bei HIV<sup>+</sup> Patienten eine sehr große Rolle spielt, ist die Zahl der invasiven Candidosen in dieser Patientengruppe vergleichsweise gering. Dies lässt sich auf die verschiedenen Abwehrmechanismen zurückführen. Invasive und disseminierte Candidosen bei HIV<sup>+</sup> Patienten treten daher häufig erst in weiter fortgeschrittenen Stadien der Infektion (Stadium: AIDS) als opportunistische Infektionen auf. Auch bei den invasiven Candidosen ist *C. albicans* nach wie vor der klinisch dominierende Erreger (40-50%). Bei den nicht-*albicans* Arten spielt vor allem *C. glabrata* eine immer wichtigere Rolle (10-12%).

#### **1.2.4 Biofilmbildung**

Bei nosokomialen Infektionen (im Krankenhaus erworbene Infektionen) spielt *C. albicans* auch wegen seiner Fähigkeit Biofilme zu bilden eine große Rolle. Sehr oft sind solche Biofilme assoziiert mit Kathetern oder Prothesen (Douglas, 2003; Kumamoto, 2002). Biofilme werden durch eine initiale Kolonisierung von Hefezellen gefolgt von Hyphen- und Pseudohyphenzellen gebildet. Die Zellen sind dabei in eine aus Glykoproteinen bestehende Matrix eingebettet (Chandra *et al.*, 2001). Ein großes Problem bei Biofilmen stellt die erhöhte Resistenz der *C. albicans* Zellen gegen Antimykotika dar (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2001; Baillie and Douglas, 1999). Als Gründe für die erhöhte Resistenz der Biofilme gegen Antimykotika werden a) die Glykoproteinmatrix als Penetrationsbarriere, b) eine verminderte Wachstumsrate der Zellen oder c) die Expression sogenannter „Resistenzgene“ diskutiert. Aktuell wird die erhöhte Resistenz der Biofilme gegen Antimykotika als ein komplexes Phänomen mit mehreren Ursachen betrachtet (Jabra-Rizk *et al.*, 2004; Douglas, 2003; Kumamoto, 2002).



### Abbildung 2. Biofilmbildung bei *C. albicans*

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung durch *C. albicans* auf einem zentralen Venenkatheter im Rattenmodell. A) Biofilm (quergeschnitten) in 1000-facher Vergrößerung, B) Übersicht des Modells in 50-facher Vergrößerung. (Quelle: (Nett and Andes, 2006)).

## 1.3 Pathogenität von *C. albicans* (Virulenzfaktoren)

*C. albicans* ist als Kommensale fest mit dem Menschen assoziiert und kann bei Schwächung der Wirtsabwehr für diverse Infektionen verantwortlich sein. Voraussetzung für eine maligne Interaktion mit dem Wirt ist die Virulenz eines Organismus, die als quantitative Eigenschaft die Pathogenität bestimmt. *C. albicans* besitzt eine ganze Reihe so genannter Virulenzfaktoren, die nicht zuletzt auch auf der Fähigkeit basieren bei 37°C, der menschlichen Körpertemperatur, wachsen zu können. Im Gegensatz zu manchen bakteriellen Erregern besitzt *C. albicans* keine den Wirt schädigenden Toxine (z.B. Cholera toxin, *Vibrio cholerae*), sondern Faktoren, die den Pilz in perfekter Anpassung an seinen Wirt (über-) leben lassen. Darüber hinaus verfügt *C. albicans* über Mechanismen (z.B. Dimorphismus), die es dem Pilz erlauben, über die Kolonisierung hinaus in das Gewebe einzudringen, den Wirt zu schädigen und lokale oder disseminierte Infektionen auszulösen. Im Folgenden sollen einige allgemeine und speziellere Virulenzfaktoren erläutert und ihre Bedeutung für das Pathogen *C. albicans* hervorgehoben werden.

### 1.3.1 Polymorphismus

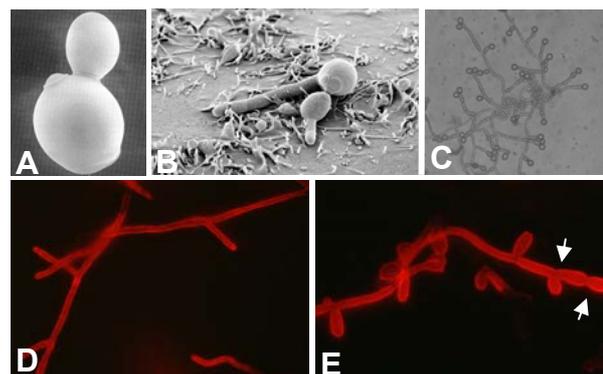
Bei *C. albicans* handelt es sich um einen polymorphen Pilz (Merson-Davies and Odds, 1989), d. h. er bildet unterschiedliche Wachstumsformen aus. In Tabelle 1 und Abbildung 3 sind die verschiedenen Morphologien zusammengefasst und dargestellt. Die morphologischen Formen, Hefen, Hyphen und Pseudohyphen können *in vivo* beobachtet werden. Hyphen und Pseudohyphen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Penetration und Invasion von Geweben, wohingegen für Hefen eine größere Rolle bei der Ausbreitung im Organismus diskutiert wird (Gow *et al.*, 2002). Die große Wichtigkeit des filamentösen Wachstums wird nicht zuletzt dadurch bewiesen, dass alle bekannten im Hyphenwachstum defizienten Mutanten in der Virulenz deutlich abgeschwächt bis avirulent erscheinen (Cao *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 1997).

Ob die attenuierte Virulenz einzig und alleine auf das defizitäre Hyphenwachstum zurückzuführen ist, wird aktuell noch diskutiert, da Gene des Hyphenwachstum mit einigen Virulenzfaktoren co-reguliert werden (Kumamoto and Vinces, 2005a; Gow *et al.*, 2002; Liu, 2002). Das Hyphenwachstum wird daher nicht als der Virulenzfaktor *per se* betrachtet, sondern als Teil einer globalen „Virulenzstrategie“, die sich aus dem Zusammenspiel diverser Faktoren zusammensetzt (Kumamoto and Vinces, 2005a).

Chlamydosporen können *in vitro* nur unter ganz bestimmten Bedingungen erzeugt werden (Jitsurong *et al.*, 1993) und konnten *in vivo* bisher kaum beobachtet werden (Cole *et al.*, 1991). Interessanterweise können Chlamydosporen nur von den humanpathogenen *Candida*-Spezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* gebildet werden, womit sie ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel in der medizinischen Mykologie sind (Martin *et al.*, 2005). Die Rolle der Chlamydosporen für die Pathogenität dieser *Candida*-Spezies konnte bis jetzt aber noch nicht determiniert werden.

**Tabelle 1. Merkmale und Stimuli der verschiedenen morphologischen Ausprägungen bei *C. albicans***

	<b>Morphologie</b>	<b>Stimulus <i>in vitro</i></b>
<b>Hefe</b>	rundlich / ovale Zellen nicht von <i>S. cerevisiae</i> zu unterscheiden	Wachstum bei 30°C < pH 6 hohe Zelldichte (>10 <sup>7</sup> /ml)
<b>Pseudo-hyphen</b>	rundliche / elongierte Zellen Seitenwände nicht parallel deutlich sichtbare Einschnürungen Breite > 2,8 µm z.T. viele Verästelungen	pH 6; 35°C SLAD-Medium
<b>Hyphen</b>	lange, fadenförmig elongierte Zellen Seitenwände parallel keine Einschnürungen Breite < 2,8 µm wenige Verästelungen	Serum >30°C > pH 7 37°C / geringe Zelldichten GlucNac-, Spidermedium, u.a.
<b>Chlamydo-sporen</b>	stark lichtbrechende, sporenlähnliche, elongierte Zellen mit verdickter Zellwand	z.B. Milch/Tween Agar, semiaerob bei Raumtemperatur



**Abbildung 3. Polymorphismus bei *C. albicans***

Die Abbildung zeigt die verschiedenen morphologischen Ausprägungen von *C. albicans*. A) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme einer Hefezelle, B) Hyphenzellen auf oralem Epithelgewebe (1 h, REM), C) Chlamydosporen auf Milch/Tween Agar, D) elongierte Hyphenzelle auf oralem Epithelgewebe (RHE) (9 h), E) Pseudohyphenzelle auf oralem Epithelgewebe (*Δeed1*, 7 h).

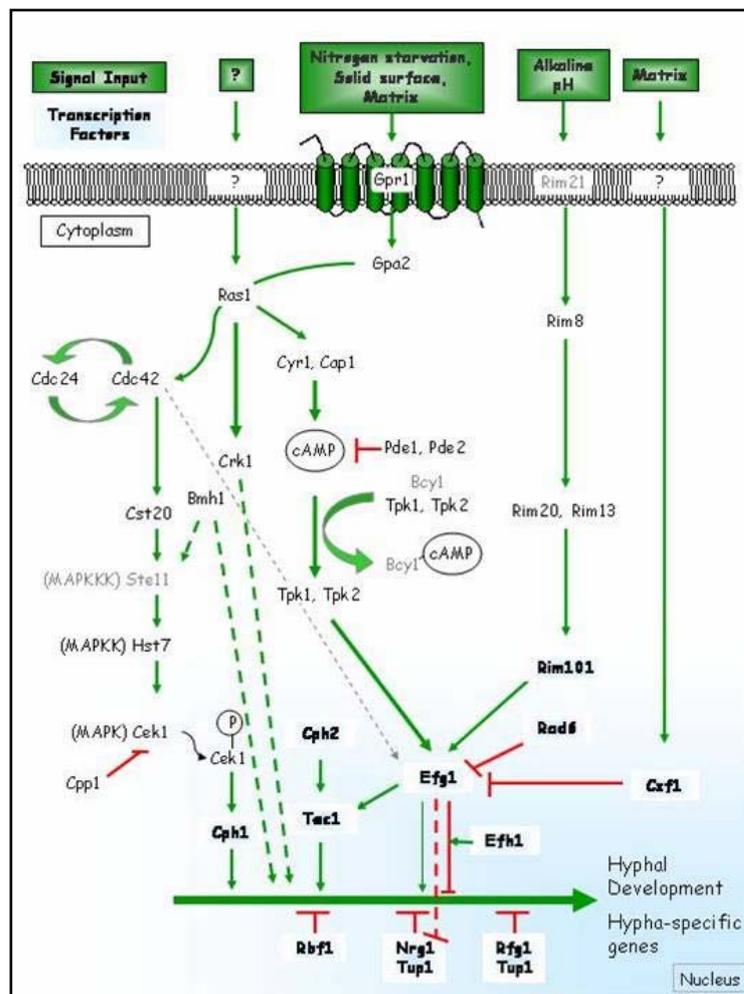
(Quelle: Abbildung A: Frank Odds, Abbildungen B-D: diese Arbeit)

### 1.3.1.1 Regulationen des Dimorphismus

Die Regulation des Dimorphismus, des Übergangs zwischen der Hefeform und der elongierten Hyphenform, gehört zu den am besten untersuchten Vorgängen in *C. albicans*. Trotzdem sind noch lange nicht alle Komponenten des sehr komplexen Systems beschrieben und erklärt. Verschiedene Signaltransduktionswege setzen dabei die von außen einwirkenden Stimuli um und führen zur Induktion des Hyphenwachstums. Ein zentraler Faktor der Hypheninduktion ist der Transkriptionsfaktor Efg1p (Stoldt *et al.*, 1997). Efg1p wurde als erste Komponente des cAMP/PKA-Weges identifiziert und umfangreiche Untersuchungen zeigten, dass es sich bei Efg1p um ein zentrales Molekül mit sowohl aktivierenden als auch repressiven Eigenschaften handelt.  $\Delta$ efg1-Zellen wachsen als verlängerte „Stäbchen“ unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen, was eine Funktion des Moleküls als Unterdrücker des Pseudomyzel Wachstums implizieren könnte (Stoldt *et al.*, 1997). Die Überexpression von Efg1p führt zu keiner Induktion des Hyphenwachstums in den Zellen, wohingegen die  $\Delta$ efg1-Mutante unter ganz bestimmten Bedingungen (eingebettet in Matrix, semiaerob) hyperfilamentös wächst (Giusani *et al.*, 2002; Sánchez-Martínez and Pérez-Martín, 2002).

Eine weitere, wichtige Komponente ist der Schlüsselfaktor des MAP-Kinase Weges, Cph1p, bei dem es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Hyphenbildung induziert (Ernst, 2000). Während eine  $\Delta$ cph1/ $\Delta$ efg1 Doppelmutante in der Hefeform arretiert ist (Lo *et al.*, 1997), zeigt die  $\Delta$ cph1 Mutante lediglich ein leicht attenuiertes Hyphenwachstum auf bestimmten Medien (Csank *et al.*, 1998; Kohler and Fink, 1996). Dies deutet die Komplexität und Verbundenheit der verschiedenen Signaltransduktionswege an, in denen mit großer Wahrscheinlichkeit auch kompensatorische Effekte eine Rolle spielen. Weitere hypheninduzierende Signaltransduktionswege sind zum Beispiel der über alkalischen pH gesteuerten *Rim101*-Weg, der ebenfalls Efg1p als Schlüsselfaktor aktiviert (Liu, 2002). Für Czf1p, ein Transkriptionsfaktor mit Zinkfingermotiv, wird angenommen, dass es die Regulation des Hyphenwachstums unter „eingebetteten“ Bedingungen reguliert, da die  $\Delta$ czf1 Mutante lediglich unter diesen Bedingungen einen hyphenassoziierten Phänotyp zeigt (Brown *et al.*, 1999). Die Repression der Hypheninduktion kann direkt durch den Einfluss der

Transkriptionsrepressoren Tup1p, Nrg1p und Rfg1p erfolgen (Khalaf and Zitomer, 2001; Murad *et al.*, 2001). Eine Übersicht über die verschiedenen Signaltransduktionswege gibt Abbildung 4. Aktiviert werden durch die Signaltransduktionswege der Morphogenese Gene, die an dem morphologischen Wechsel in *C. albicans* beteiligt bzw. für diesen essentiell sind. Der komplette Mechanismus der Hyphenbildung ist jedoch noch nicht abschließend geklärt und noch immer Gegenstand intensiver Forschung. Die Regulation anderer morphologischer Formen (Chlamydosporen und Pseudohyphen) ist weitgehend unbekannt.



**Abbildung 4. Graphische Darstellung der hyphenassoziierten Signaltransduktionswege in *C. albicans***

In der Abbildung sind die Schlüsselkomponenten des cAMP/PKA-Signalweges, des MAPK-Signalweges sowie des RIM101-Signalweges dargestellt. Die Stimulation des Hefe/Myzel Übergangs erfolgt über extrazelluläre Signale und führt zur Expression hyphenspezifischer Gene. (Mit freundlicher Erlaubnis von Dr. A. Mavor, „Transcriptional Regulation of Morphogenesis in *Candida albicans*“ PhD thesis in Microbiology at the University of Aberdeen, 2004)

### 1.3.2 Adhäsionsfaktoren und Kontakt zu Oberflächen

Die Verankerung (Adhärenz) an Oberflächen ist die wichtigste Voraussetzung für *C. albicans* um als Kommensale oder Pathogen bestehen zu können. Auf der anderen Seite ergibt sich durch den physikalischen Kontakt zum Wirt für diesen die Möglichkeit auf das Pathogen zu reagieren.

Für das Adhäsionsverhalten von *C. albicans* sind sowohl Zelloberflächeneigenschaften (Hydrophobizität) verantwortlich, als auch bestimmte Proteine (Adhäsine). Die Hydrophobizität der Oberfläche wird durch verschiedene Faktoren wie der Morphologie (Rodrigues *et al.*, 1999), dem Glykosylierungszustand und der Anwesenheit verschiedener Detergentien oder Antimykotika bestimmt (Ellepola and Samaranayake, 1998). Generell weisen hydrophobe Zellen eine stärkere Adhäsion auf. Zu den wichtigsten Adhäsinen in *C. albicans* gehören Mitglieder der Als- (Agglutinin-like Sequence)-Glykoproteinfamilie (Hoyer, 2001) und Hwp1p, ein hyphenspezifisches Zellwandprotein und mögliches Substrat für die Säugetiertransglutaminase (Sundstrom, 1999). Darüber hinaus gibt es eine ganze Reihe anderer Faktoren bei denen sich eine Deletion der entsprechenden Gene negativ auf die Adhärenzeigenschaften ausgewirkt hat (Sundstrom, 1999). Einige der Adhäsine, z.B. Als3p, werden nur in Hyphenzellen exprimiert, während für andere eine Korrelation mit der Wachstumsphase gezeigt werden konnte (Hoyer, 2001). Experimente, in denen *C. albicans* mit Oberflächen interagiert oder eingeschlossen in Agar („eingebettet“) ist, zeigten die unmittelbare Induktion der Hyphenmorphologie in *C. albicans*. Dabei konnte gezeigt werden, dass es weniger die Umstände (Medien etc.) sind, die den Wechsel induzieren, als der physikalische Kontakt an sich (Kumamoto and Vines, 2005b). Dies deutet an, dass die initiale Adhärenz und die Hyphenbildung als komplex verbundene Prozesse angesehen werden müssen, und dass Adhärenz immer auch den ersten Schritt für eine Invasion darstellen kann (Kumamoto and Vines, 2005b).

### 1.3.3 Sekretierte hydrolytische Enzyme

Die Sekretion hydrolytischer Enzyme spielt eine wichtige Rolle bei der Aufarbeitung verschiedener Nährstoffe. Auch bei der Invasion in Wirtsgewebe spielt die Sekretion hydrolytischer Enzyme eine wichtige Rolle. *C. albicans* besitzt

mindestens 3 Familien sekretorischer Hydrolasen: die Familie der sekretorischen Asparatproteasen (Sap), die Familie der Lipasen (Lip) sowie die Familie der Phospholipasen (Pl) (Schaller *et al.*, 2005a). Erste Hinweise auf eine extrazelluläre Proteaseaktivität wurden bereits 1965 beschrieben (Staib, 1965); das erste Gen der mittlerweile 10 Gene umfassenden SAP-Genfamilie aber erst 1991 beschrieben (Hube *et al.*, 1991). Die verschiedenen Sap Proteine werden unter variierenden Bedingungen differentiell exprimiert (Naglik *et al.*, 2003a; Schaller *et al.*, 2003), z.B. konnte für Sap4-6 eine erhöhte Expression in Hyphen nachgewiesen werden (Felk *et al.*, 2002). Die Regulation von SAP4-6 ist dabei interessanterweise teilweise von Efg1p und Cph1p abhängig, den bereits erwähnten Schlüsselfaktoren des filamentösen Wachstums in *C. albicans* (Felk *et al.*, 2002; Staib *et al.*, 2002).

#### **1.3.4 Adaptation und Signaltransduktion**

Die Etablierung als Kommensale oder das Überleben als Pathogen in einem Wirt basiert ganz maßgeblich auf der Fähigkeit, sich der Umgebung anpassen und auf mögliche Änderungen reagieren zu können. Als Kommensale besiedelt *C. albicans* verschiedenste Bereiche im menschlichen Körper und zeigt daher eine breite Anpassungsfähigkeit an sehr unterschiedliche Umgebungsbedingungen. Bei der Induktion des morphologischen Wechsels (Hefe/Myzel Übergang) in *C. albicans* spielen vor allem die Temperatur (37°C), ein neutraler pH-Wert, Kontakt zu Serum oder Oberflächen sowie verschiedene Kohlenstoffquellen eine wichtige Rolle. Hohe Zelldichten, eine niedrige Temperatur, sowie saure pH-Werte induzieren dagegen das Hefewachstum in *C. albicans* (Sudbery *et al.*, 2004; Odds, 1988). Die Reaktionen auf die verschiedenen Stimuli werden dabei über die verschiedenen Signaltransduktionswege eingeleitet. Die bereits in Abschnitt 1.4.1 (Polymorphismus) beschriebenen cAMP- und MAPK-Signalwege spielen dabei eine wichtige Rolle. Experimentelle Hinweise implizieren, dass Stimuli wie Serum, bestimmte C- und N- Quellen oder eine hohe Temperatur über diese Signalwege verarbeitet werden (Monge *et al.*, 2006; Borges-Walmsley and Walmsley, 2000). Die Hypheninduktion durch ein alkalisches pH- Milieu wird hingegen über einen weiteren Signalweg, den RIM101-Signalweg, reguliert (Bensen *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2000). Auf oxidativen und osmotischen Stress können *C. albicans* Zellen

über die sogenannten „Zwei-Komponenten-Signalwege“ reagieren. Diese auf Bakterien und niedere Eukaryoten begrenzten Systeme, nehmen externe Stimuli durch eine Histidinkinase auf und geben das Signal über autophosphorylierende Vorgänge in der Zelle weiter. Auch in *C. albicans* wurden verschiedene Histidinkinasen und die entsprechenden „Response-Regulatoren“ beschrieben. Die mechanistischen Vorgänge der Signalwege sind jedoch noch weitestgehend unbekannt (Kruppa and Calderone, 2006). Auch das sogenannte *Quorum Sensing*, ein auf speziellen Molekülen basierender kommunikativer Vorgang, der primär bei Bakterien beschrieben wurde, scheint bei *C. albicans* eine regulatorische Rolle zu spielen (Nickerson *et al.*, 2006). Neben nahrungsphysiologischen Stimuli wie Serum oder bestimmten Kohlenstoffquellen, konnte für *C. albicans* gezeigt werden, dass die Zelldichte eine regulatorische Komponente des Hyphenwachstums ist. Die Verdünnung hoher Zelldichten in frisches Medium führt in *C. albicans*, unabhängig vom umgebenden Medium, zu einer transienten Hypheninduktion (Enjalbert and Whiteway, 2005) wobei Farnesol und Tyrosol für *C. albicans* als *Quorum sensing* Moleküle identifiziert werden konnten. Farnesol inhibiert dabei den Hefe/Myzel Übergang (Hornby *et al.*, 2001), Tyrosol verkürzt die Lag-Phase und induziert den Hefe/Myzel Übergang (Chen *et al.*, 2004). Eine Studie konnte zeigen, dass bestimmte Histidinkinasen an der Weitergabe des durch Farnesol induzierten Signals beteiligt sind (Kruppa *et al.*, 2004), die genauen mechanistischen Vorgänge sind jedoch noch unklar.

Durch die in den letzten Jahren möglich gewordenen Transkriptom- und Proteomuntersuchungen können erstmals die globalen, adaptiven Eigenschaften von *C. albicans* an den Wirt oder die Umgebungsbedingungen untersucht werden. So wurden genomweite Transkriptionsprofile von *C. albicans* bei der Interaktion mit Blut (Fradin *et al.*, 2003), Hämoglobin (Pendrak *et al.*, 2004), Makrophagen (Lorenz and Fink, 2002), neutrophilen Granulozyten (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003), Stickstoffmonoxid (NO<sup>\*</sup>) (Hromatka *et al.*, 2005), oxidativem Stress (Chauhan *et al.*, 2006), Lipiden (Shea and Del Poeta, 2006) alkalischen pH (Bensen *et al.*, 2004) und CO<sub>2</sub> (Klengel *et al.*, 2005) analysiert. Auch der Hefe/Myzel Übergang wurde bereits mehrfach auf transkriptioneller Ebene untersucht (Kadosh and Johnson, 2005; Marcus *et al.*, 2004; Nantel *et al.*, 2002). In allen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Gene und Gengruppen die Anpassung an die Umgebung ermöglichen.

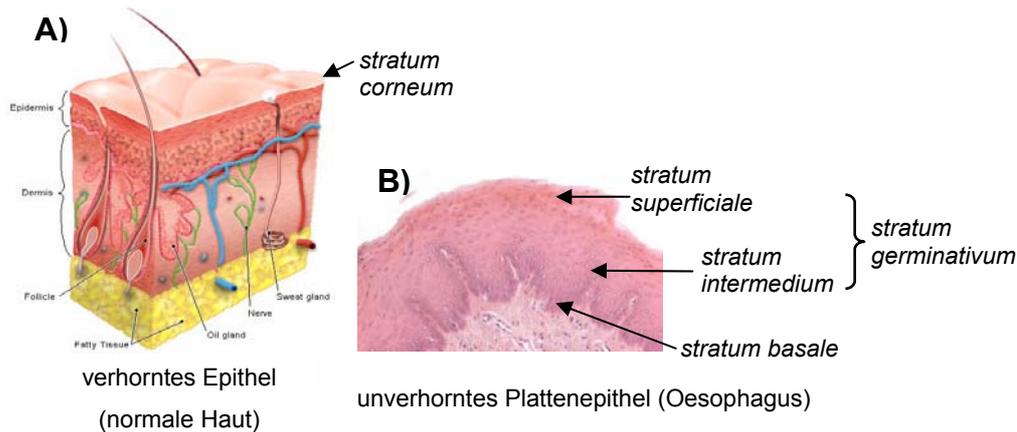
Neben der Expression spezifischer Virulenzfaktoren sind somit auch die Fähigkeiten sich an den Wirt anzupassen, mit ihm zu interagieren und auf Wirtsaktivitäten zu reagieren, wichtige Aspekte der Wirt-Pathogen Interaktion.

## **1.4 Epithelgewebe und mukosale Immunität**

*C. albicans* kann aus einer Vielzahl von Körperregionen isoliert werden. Dies reflektiert nicht nur eine breite nahrungsphysiologische Anpassung des Pilzes sondern auch eine Adaptation an Abwehrstrategien der einzelnen menschlichen Zellen und Gewebe. In der Mundhöhle des Menschen interagiert *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe und ist den lokalen Umständen und Abwehrmechanismen des Epithelgewebes ausgesetzt. Im Folgenden sollen die Strukturen epithelialen Gewebes dargestellt werden und die Abwehrmechanismen der Epithelgewebe, auch hinsichtlich prädisponierender Faktoren für eine *C. albicans* Infektion, erläutert werden.

### **1.4.1 Orales Epithelgewebe**

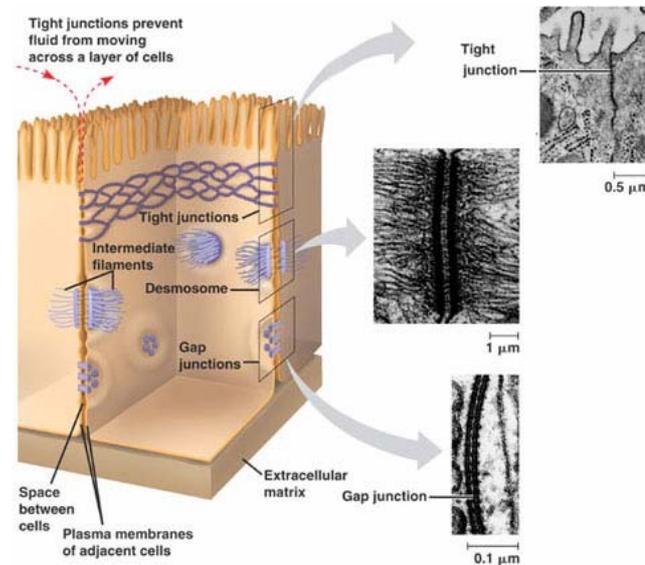
Epithelgewebe oder Epithelium (von griech.: ἐπί, epí, „auf, über“; θηλή, thelé, „Mutterbrust, Brustwarze“) bezieht sich ganz allgemein auf Zellen, die Hohlorgane oder Drüsen säumen, oder die äußere Begrenzung des Körpers bilden. Dabei kommen den Geweben vielseitige Funktionen wie Schutz, Aufnahme, Sekretion, Exkretion oder sensorische Aufgaben zu. Oberflächliche Epithelgewebe, die hauptsächlich einen mechanischen Schutz tiefer liegender Strukturen gewährleisten, bestehen dabei meist aus eng zusammen liegenden Zellen ohne Blutgefäße und sehr kleinen interzellulären Bereichen (Bucher and Wartenberg, 1997). Die Mundhöhle, ein in sich fast geschlossener Bereich, in welchem keine direkte Gefahr der Austrocknung besteht, ist gesäumt von sogenannter Schleimhaut, einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel. Im Gegensatz zu anderen Oberflächenepithelien (z.B. Haut) besitzt die menschliche mukosale Schleimhaut keine keratinisierte, feste Oberflächenschicht (*stratum corneum*) (Bucher and Wartenberg, 1997).



### Abbildung 5. Verhorntes und unverhorntes Epithel

A) Die normale Haut wird apikal durch eine Hornschicht begrenzt. Die Dicke der Hornschicht variiert dabei je nach Beanspruchung. Morphologisch sind die Veränderungen der ausdifferenzierten Zellen an der Zellmembran, dem Abbau aller Zellbestandteile sowie der Bildung weiteren Keratins nachweisbar. B) Unverhorntes Epithel besitzt keine derart ausdifferenzierte, feste Oberfläche. Epithelgewebe im oralen Bereich sind zumeist ganz schwach (Zunge, Gaumen) oder gar nicht verhornt (Bucher and Wartenberg, 1997).

Epitheliales Gewebe ist charakterisiert durch polarisiertes Wachstum, d.h., die einzelnen Zellen haben eine apikale und eine basale Seite sowie laterale Bereiche. Das Wachstum, die Erneuerung und Differenzierung des Gewebes findet daher gerichtet, von innen heraus, statt. Begrenzt ist epitheliales Gewebe an angrenzende Strukturen durch die *Lamina basalis* (Basalmembran), einer Matrixstruktur mit stützender Funktion sowie der abschließenden *Lamina propria*, eine aus lockerem Bindegewebe bestehende Eigenschicht, die zudem Nerven und Gefäße beinhaltet. Strukturelle Verbindungen, Adhärenz und Kommunikation zwischen den Zellen sind lateral und apikal über definierte Strukturen gewährleistet (*junctions*). Sogenannte *tight junctions* (lat.: *Zonula occludens*, enge Verbindungen) stellen eine enge Verbindung zwischen benachbarten Zellen durch aneinanderliegende Membranproteine her. Diese Kontakte bilden eine Diffusionsbarriere, die den Transport von Molekülen zwischen den benachbarten Zellen kontrolliert. Zelladhäsionsmoleküle (*anchoring junctions*) verbinden die Zellen miteinander und stellen gleichzeitig oft auch Transport- und Kommunikationsstrukturen dar. *Gap junctions*, so genannte „kommunikative Verbindungen“, stellen unselektive permeable Poren des passiven Transmembrantransportes dar.



**Abbildung 6. Zell-Zell-Verbindungen in epitheliale Gewebe**

Die elektronenmikroskopisch sichtbaren *tight junctions* bewirken eine Verschmelzung der Membranen benachbarter Zellen, was diese eng miteinander verbindet und zu einem vollständigen Verschluss der Interzellularspalten führt. Verschiedene Haft- und Kommunikationsverbindungen tragen zu Zusammenhalt und Haftung der Zellen, sowie der interzellulären Kommunikation bei (Bucher and Wartenberg, 1997).

#### 1.4.2 Mukosale Abwehrmechanismen, Immunität und HIV

Die Mundhöhle wird von einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen besiedelt, darunter anaerobe und aerobe Bakterien, Protozoen, Viren und Pilze (Jenkinson and Lamont, 2005). Generell unterscheidet man zwischen der sogenannten „Standortflora“, Mikroorganismen, die als Teil der natürlichen Flora regelmäßig isoliert werden können und einer „Durchgangflora“, die aus Keimen besteht, welche nur einmal nachgewiesen werden können. *C. albicans* stellt dabei bei einem Großteil der Bevölkerung einen Teil der natürlichen Standortflora dar, der größte Teil der oralen Mikroflora wird jedoch von bis zu 750 verschiedenen Bakterienarten repräsentiert (Jenkinson and Lamont, 2005).

Die Kontrolle und Regulation der mikrobiellen Flora erfolgt zum einen durch autoregulatorische Vorgänge (Verfügbarkeit von Nährstoffen, natürliche Selektion und Konkurrenz zwischen den Organismen) sowie durch antimikrobielle Komponenten, die mit dem Speichel oder durch Epithelzellen sezerniert werden. Auch Komponenten des mukosalen Immunsystems spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Abwehr von Mikroorganismen.

### 1.4.2.1 Unspezifische Abwehrmechanismen

Unspezifische Abwehrmechanismen zeichnen sich durch eine unselektive Interaktion mit den Mikroorganismen aus und stellen einen wesentlichen Teil der natürlichen Kontrolle und Regulation der oralen Mikroflora dar.

Das die Mundhöhle auskleidende orale Epithel stellt eine physikalische Barriere in der Mundhöhle dar. So werden z.B. adhärierte Mikroorganismen durch die sich fortwährend erneuernde epitheliale Oberfläche entfernt (Abschuppung der oberflächlichen Zellen). Auch Speichel und der latente Speichelfluss tragen durch abwaschende und antimikrobielle Eigenschaften zu einer ausgeglichenen Mikroflora bei (Nagy *et al.*, 2000). Die diversen antimikrobiellen Proteine im Speichel stellen dabei einen ganz erheblichen Teil der unspezifischen Abwehrmechanismen in der Mundhöhle dar. Die Glukosidase Lysozym liegt in hohen Konzentrationen im Speichel vor (bis 60 µg/ml) und wirkt auf die Zellwand und Zellmembranen von *C. albicans* durch die Lyse intermolekularer Verbindungen (Samaranayake *et al.*, 2001). Laktoferrin, ein Mitglied der Transferrine, fungiert als Eisenchelator. Laktoferrin liegt ebenfalls in hohen Konzentrationen im Speichel vor, und der antimikrobielle Effekt basiert sowohl auf der Bindung von Eisen (Wachstumshemmung für Mikroorganismen) als auch der strukturellen Schädigung der Zellwand von *C. albicans* (Nikawa *et al.*, 1993). Durch das im Speichel vorkommende Enzym Laktoperoxidase (LPO) wird Thiocyanat mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Hypothiocyanat umgesetzt. Hypothiocyanat behindert den Metabolismus von Mikroorganismen, indem es Enzyme der Glykolyse und des Kohlenhydrattransportes hemmt und somit für viele Mikroorganismen toxisch ist (Tenovuo *et al.*, 1981). Bei der Familie der Histatine handelt es sich um eine aus mindestens 12 Mitgliedern bestehende Gruppe, histidinreicher, positiv geladener Speichelproteine. Für einige Mitglieder konnte eine antimikrobielle Funktion gezeigt werden, wie z.B. die Interaktion von Histatin 5 mit *C. albicans* (Helmerhorst *et al.*, 2001). Dabei wird das Protein in die Pilzzelle aufgenommen, gelangt in die Mitochondrien und inhibiert die mitochondriale Atmung der Zelle durch die Bildung „Reaktiver Sauerstoff Spezies“ (ROS). Auch für Histatin 3 konnte eine inhibierende Wirkung auf *C. albicans* gezeigt werden (Xu *et al.*, 1999). Bei den humanen β-Defensinen (HBD) handelt es sich um kleine, antimikrobielle Proteine, die nicht mit dem Speichel sezerniert werden, sondern durch

Epithelzellen exprimiert werden (Schneider *et al.*, 2005). *HBD1* wird dabei konstitutiv exprimiert und übernimmt somit eine die Mikroflora kontrollierende Rolle, wohingegen die Proteine *HBD2-4* durch die Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen (u. a. durch *C. albicans*) induziert werden. Der antimikrobielle Mechanismus bei Bakterien basiert dabei auf der kompetitiven Bindung der positiv geladenen Moleküle mit der zum Teil negativ geladenen Oberfläche mancher bakterieller Mikroorganismen, was zu Depolarisation der Membran und Zellschädigungen führen kann (Schneider *et al.*, 2005). Für Viren und Pilze sind die Mechanismen noch unklar.

Zelluläre Komponenten wie die Neutrophilen Granulozyten oder das Monozyten-Makrophagensystem stellen die Schnittstelle zwischen spezifischer und unspezifischer Abwehr dar. Eingewandert in epitheliale Gewebe verläuft die Abwehr über Phagozytose kombiniert mit oxidativen (z.B.  $H_2O_2$ ,  $NO^*$ ) oder nicht-oxidativen (antimikrobielle Proteine) Komponenten. Die Aktivität dieser zellulären Komponenten kann durch bestimmte Zytokine (z.B.  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-2$ ) induziert oder verstärkt werden.

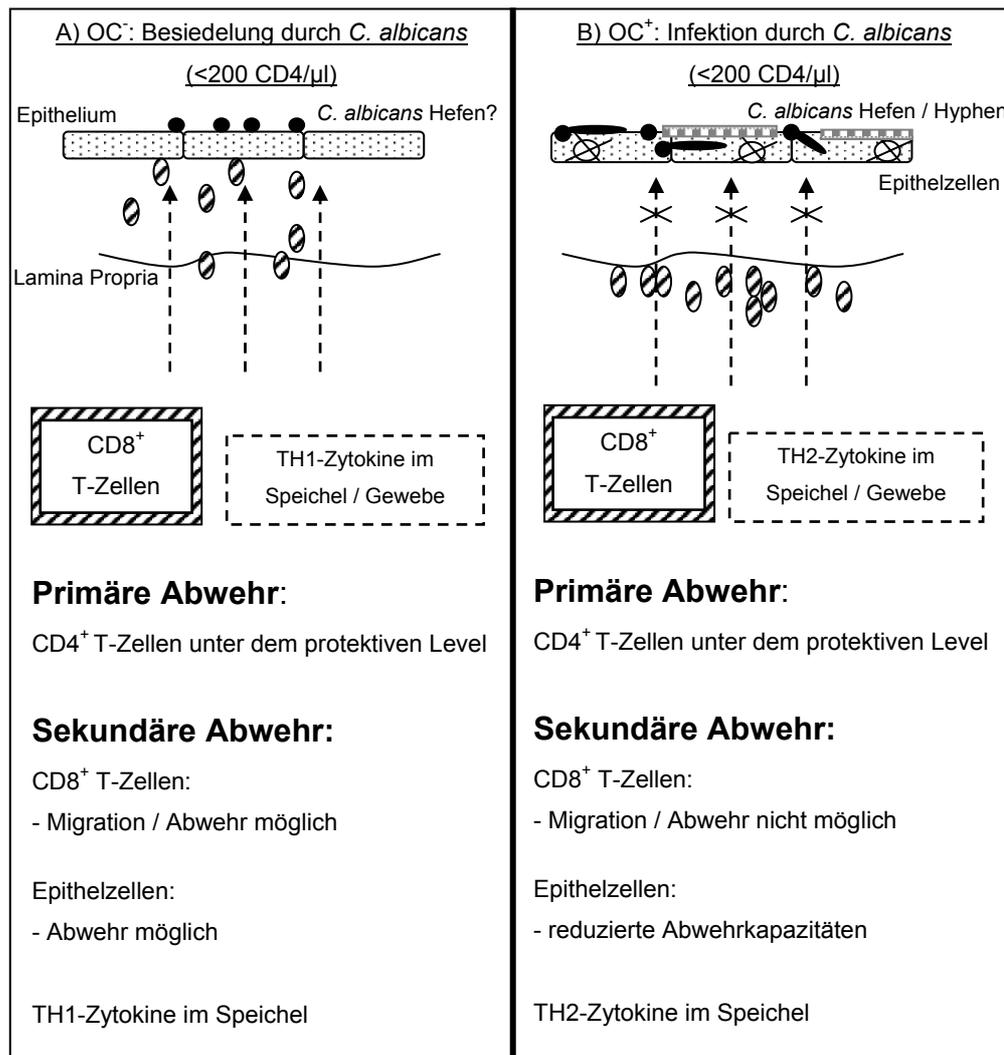
#### **1.4.2.2 Spezifische mukosale Abwehrmechanismen in gesunden Probanden und HIV<sup>+</sup> Patienten**

Der Kontakt mit den unterschiedlichsten Antigenen von Bakterien, Pilzen oder Protozoen induziert eine primäre, unspezifische Immunreaktion, die zur Bildung eines bestimmten Zytokinmilieus führt, welches für die weiterführende Immunreaktion entscheidend ist. Dabei basiert die spezifische Immunabwehr gegen *C. albicans* vor allem auf einer zellassozierten Immunität, humorale Komponenten (Antikörper) spielen eine eher untergeordnete Rolle (Millon *et al.*, 2001; Wray *et al.*, 1990). Werden z.B. *C. albicans* Antigene durch dendritische (DC)- oder Langerhanszellen lokalen T-Zellen präsentiert, kommt es zu Induktion einer  $CD4^+$ -TH1-Zell assoziierten Immunantwort, welche weiterführend über die Aktivierung von Makrophagen und die Erzeugung eines TH1-assozierten Zytokinmilieus zum Abtöten des Pathogen führt.  $CD4^+$ -T-Zellen stellen daher in gesunden Individuen die primäre Linie der Wirtsabwehr gegen *C. albicans* dar. TH1- assoziierten Zytokinen im Speichel kommt dabei ebenfalls eine schützende Funktion zu (Molecular Principles of Fungal Pathogenesis Heitman *et al.*, 2006).

An oralen *C. albicans* Infektionen erkranken insbesondere immundefiziente Patienten. Vor allem bei HIV<sup>+</sup> Patienten spielt die orale *C. albicans* Infektion eine wichtige Rolle: 50-95% aller HIV<sup>+</sup> Patienten erleiden eine Episode einer oralen *C. albicans* Infektion im Verlauf ihrer Krankheit (Rabeneck et al., 1993). Dabei scheint die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine kritische Rolle zu spielen. Sinkt die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unter einen Schwellenwert von 200 CD4<sup>+</sup> T-Zellen/ $\mu$ l, steigt das Risiko an einer oralen *C. albicans* Infektion zu erkranken signifikant (Greenspan et al., 2000; Schuman et al., 1998; Rabeneck et al., 1993). Studien mit HIV<sup>+</sup> Patienten und gesunden Kontrollgruppen (HIV<sup>-</sup>) zeigten, dass unter immunsupprimierten Bedingungen nicht die *C. albicans* spezifischen T-Zellen einen Defekt aufweisen, sondern eine kritische Menge an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen essentiell ist (Leigh et al., 2001; Kunkl et al., 1998). Sinkt die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unter den kritischen Schwellenwert, basieren die verbleibenden Schutzmechanismen auf unspezifischen und epithelialen Abwehrmechanismen, TH1-Zytokine im Speichel oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Gewebe. Diese Mechanismen können ausreichend sein, so dass einige (wenige) Patienten mit einer Anzahl von < 200 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen/ $\mu$ l keine orale *C. albicans* Infektion erleiden (Fidel, 2006).

Für HIV<sup>+</sup> Patienten, welche eine orale *C. albicans* Infektion erleiden, konnte in späteren Stadien eine Reduktion der TH1- assoziierten Zytokine im Speichel beobachtet werden, was ebenfalls einen verminderten Schutz darstellt (Leigh et al., 1998). Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang wird ferner für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen diskutiert. In Studien konnten Akkumulationen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Peripherie der *C. albicans* Plaques im Gewebe identifiziert werden, wobei keine Akkumulation der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in gesundem Gewebe festgestellt werden konnte (Myers et al., 2003). In immunhistologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der aus erkranktem Gewebe isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen  $\alpha\beta$ -T-Zell Rezeptoren (TCR) exprimieren (McNulty et al., 2005). Die zelluläre Migration innerhalb oder zwischen verschiedenen Geweben wird durch sogenannte *homing receptors* (Leitrezeptoren) und Adhärenzmolekülen auf den Gewebezellen kontrolliert. Auf diese Weise findet eine Regulation der Migration vom Blut in Gewebe oder durch Gewebe hindurch statt. Der  $\alpha_4\beta_7$ -TCR bindet dabei z.B. an MAdCAM auf Gewebezellen (Migration in das Gewebe), der  $\alpha_e\beta_7$ -TCR bindet an E-cadherin, um durch das Gewebe zu migrieren. Untersuchungen in mit *C. albicans* infizierten Geweben mit starken klinischen Symptomen zeigten keine

Unterschiede bezüglich den *homing receptors* und deren quantitativen Ausprägung im Vergleich zu nicht infiziertem Gewebe. Im Gegensatz dazu konnten Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle festgestellt werden. So ist z.B. die MAdCAM Expression in Patienten mit einer oralen *C. albicans* Infektion deutlich erhöht, was in Einklang mit der erhöhten T-Zell Zahl im Gewebe steht. Auf der anderen Seite stellte sich die Expression von E-cadherin signifikant verringert dar, was eine Migration der CD8<sup>+</sup>T-Zellen durch das Gewebe verhindert und es somit zu Akkumulationen in der Peripherie der *C. albicans* Plaques kommen kann (McNulty et al., 2005). Dieser Mangel an E-cadherin im Gewebe, zusammen mit der dadurch bedingten verringerten Migrationsfähigkeit der T-Zellen im Gewebe, könnte ein Grund für die erhöhte Anfälligkeit des Gewebes für eine orale *C. albicans* Infektion darstellen (Fidel, 2006). Zusammenfassend stellt sich der epitheliale Schutz gegen *C. albicans* Infektionen als ein komplexer, aus einer primären und einer sekundären Antwort bestehender Mechanismus dar. Der primäre Schutz in gesunden Individuen basiert auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Schutz ist in HIV<sup>+</sup> Patienten mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen <200/µl nicht mehr gewährleistet, so dass sekundäre Schutzmechanismen, bestehend aus Zytokinen im Speichel, unspezifischen (epithelialen) Abwehrmechanismen oder gewebeassoziierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine weitere Linie der Abwehrmechanismen darstellen können. Die protektiven Mechanismen der CD8<sup>+</sup> T-Zell Aktivität sind noch nicht untersucht und aktuell noch spekulativ (Fidel, 2006).



**Abbildung 7. Spezifische Abwehrmechanismen in HIV<sup>+</sup> Patienten ohne und mit oraler Candidose (OC)**

A) Protektive Mechanismen in HIV<sup>+</sup> Patienten mit CD4<sup>+</sup>-T Zellen unter dem protektiven Level (<200 /µl) basieren auf unspezifischen Abwehrmechanismen, epithelialer Abwehr und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (sekundäre Abwehr). Die sekundären Abwehrmechanismen kontrollieren die *C. albicans* Besiedelung und können eine Infektion verhindern.

B) Orale Infektion durch *C. albicans* (OC<sup>+</sup>). HIV<sup>+</sup> Patienten mit CD4<sup>+</sup>-T Zellen unter dem protektiven Level (<200 /µl). Die Migration der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Gewebe kann nicht mehr stattfinden, die epithelialen Abwehrmechanismen sind stark eingeschränkt und reduzierte TH1-Zytokin Konzentrationen erhöhen die Anfälligkeit des oralen Epithelgewebes für eine orale Candidose. (nach (Leigh *et al.*, 2004))

## 1.5 Experimentelle Infektionsbiologie

*C. albicans* besiedelt als einer der wenigen kommensalen Pilze Haut und Schleimhäute des Menschen und kann in immundefizienten Patienten lokale und systemische Infektionen hervorrufen. Um die Vorgänge und Mechanismen zu untersuchen mit denen *C. albicans* mit den verschiedenen Geweben interagiert und die dem Wechsel zwischen Kommensale und pathogenem Organismus zugrunde liegen, wurden in den vergangenen Jahren diverse Infektionsmodelle etabliert. Im Folgenden sollen einige Infektionsmodelle vorgestellt werden.

### 1.5.1 Infektionsmodelle

Da *C. albicans* aus diversen Bereichen des menschlichen Körpers isoliert werden kann, wurden im Laufe der Jahre etliche Infektionsmodell etabliert, mit denen die Interaktion von *C. albicans* mit dem Wirt untersucht wurde. Dabei wurden sowohl Zellkulturmodelle (Makrophagen (Lorenz et al., 2004), neutrophile Granulozyten (Rubin-Bejerano et al., 2003), Epithel- und Endothelzellen (Park et al., 2005; Phan et al., 2005)) als auch Gewebemodelle (orales und vaginales Epithelgewebe (Schaller et al., 2005b; Schaller et al., 1999a)) oder Tiermodelle (Eimodell (Gow et al., 2003), Fruchtfliegen (Alarco et al., 2004), Kaninchen (Schinabeck et al., 2004), Larven (Brennan et al., 2002) und Ratten (Andes et al., 2004)) verwendet. Mit den Zellkulturmodellen wird dabei primär die Interaktion auf zellulärer Ebene, sowie die Adhärenz- und Penetrationseigenschaften von *C. albicans* untersucht. Ferner wird die Interaktion von *C. albicans* mit einzelnen, ausgesuchten Zellmodellen auf globaler Ebene mit Hilfe der so genannten *-omics* Technologien untersucht (Genomics / Transcriptomics / Proteomics). Die Gewebe- und Tiermodelle dienen der komplexeren Analyse der Virulenz und des Adaptationsvermögens von *C. albicans*. In diesen Modellen werden vorwiegend *C. albicans* Deletionsmutanten auf deren Virulenzverhalten hin untersucht. Bei Gewebemodellen wird die Virulenz der getesteten *C. albicans* Stämme im Bezug auf deren Fähigkeit Zellschädigungen hervorzurufen, determiniert. Bei Tiermodellen wird die Mortalitätsrate der infizierten Tiere bestimmt.

### **1.5.1.1 Interaktion mit oralen Epithelzellen: Induzierte Endozytose**

Die Mechanismen mit denen *C. albicans* orale Infektionen hervorruft sind nur teilweise bekannt. Wie bei einigen bakteriellen Mikroorganismen auch, scheint jedoch die Adhärenz eine wichtige Funktion bei der Initiierung der Infektion zu spielen. Park *et al.* (Park *et al.*, 2005) konnten anhand eines epithelialen, oralen Zellkulturmodells zeigen, dass a) *C. albicans* Hyphenzellen die überwiegende Zellform der epithelialen Interaktion darstellen, und dass b) *C. albicans* seine eigene Aufnahme in die epithelialen Zellen induzieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme der elongierten *C. albicans* Hyphen durch die Bildung mikrofilamentöser Strukturen der Epithelzellen, die mit den Hyphenzellen interagierten, begleitet wurde. Diese Interaktion konnte durch Cytochalasin D, einem Aktinfilament-Inhibitor, unterbunden werden. *C. albicans* Stämme mit einer defekten Hyphenbildung wurden nicht oder nur sehr schwach von den Epithelzellen aufgenommen. Dem entsprechend wurden getötete Hyphenzellen durch die Epithelzellen zwar aufgenommen, es fand jedoch so gut wie keine Zellschädigung statt. Ähnliche Ergebnisse konnte auch für die Interaktion mit Endothelzellen gezeigt werden (Phan *et al.*, 2005). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion von *C. albicans* mit oralen Epithelzellen zum Einen auf einer induzierten Endozytose beruht und zum Anderen auf einer aktiven Penetration seitens der elongierten Pilzzelle. Hierbei könnten bekannte Virulenzfaktoren wie hydrolytische Enzyme eine wichtige Rolle spielen.

### **1.5.1.2 Orale Infektionsmodelle**

Um die Interaktion während einer oralen Infektion zu untersuchen stehen nur wenige Modelle zur Verfügung. Schaller *et al.* (Schaller *et al.*, 1998) etablierten ein orales Gewebemodell (RHE), an dem vor allem die Bedeutung hydrolytischer Enzyme (Proteasen und Lipasen) für die Virulenz von *C. albicans* untersucht wurde (Schaller *et al.*, 2006). Anhand einiger weniger oraler Mausmodelle wurde vor allem die Wirtsseite und die immunologischen Vorgänge während einer oralen *C. albicans* Infektion untersucht (Lewandowski *et al.*, 2006; Takakura *et al.*, 2003; Farah *et al.*, 2002). Es ist jedoch anzumerken, dass sich das orale Gewebe von Mäusen auf Grund seiner stärkeren Verhornung deutlich von humanem Gewebe unterscheidet (M. Kretschmer, persönliche Mitteilung). Weitere Studien wurden mit

Gewebematerial durchgeführt welches aus der Mundhöhle humaner HIV<sup>+</sup> Patienten isoliert wurde, die an einer oralen Candidose erkrankt waren. Dabei wurden sowohl die Expression und Sekretion hydrolytischer Enzyme als auch die immunologischen Vorgänge seitens des humanen Wirtes untersucht (Leigh *et al.*, 2006; Naglik *et al.*, 2003b; Schaller *et al.*, 1999b; Leigh *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1998).

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenese der oralen Candidose molekularbiologisch zu analysieren (Adhärenz- und Invasionsmechanismen), Transkriptionsprofile von *C. albicans* als Pathogen zu erstellen und durch die Interpretation der Transkriptionsprofile möglicherweise neue infektionsassoziierte Gene zu identifizieren und zu charakterisieren. Dazu wurden Transkriptionsprofile mit zwei verschiedenen Probenarten erstellt. Zum einen wurde ein *in vitro* Modell verwendet (orales Gewebemodell, RHE) und zum anderen *in vivo* Proben (Abstriche von HIV<sup>+</sup> Patienten die an einer oralen Candidose erkrankt waren). Ausgewählte, anhand dieses Modells identifizierte Gene sollten ausgeschaltet und in weiterführenden Virulenzstudien untersucht und analysiert werden.

Die Ziele und die experimentelle Vorgehensweise sind im Folgenden zusammengefasst:

### 1) Etablierung eines *in vitro* Infektionsmodells mit humanen oralen Epithelzellen

- Licht- und elektronenmikroskopische Analysen der Pilzmorphologie auf der Epitheloberfläche
- Molekularbiologische sowie licht- und elektronenmikroskopische Analysen zum Adhärenzverhalten des Pilzes auf der Epithelzelle
- Untersuchungen zum Einfluss lokaler Faktoren seitens des Epithels oder der Mundhöhle (z.B. pH-Wert, Speichel, Immunsystem, etc.)

## 2) Identifizierung von infektionsassoziierten Genen bei oralen *C. albicans*

### Infektionen

- Erstellung von Transkriptionsprofilen von *C. albicans* in einem *in vitro* Infektionsmodell
- Erstellung von *in vivo* Transkriptionsprofilen mit Abstrichen aus HIV<sup>+</sup> Patienten, die unter einer oralen *C. albicans* Infektion leiden
- Analyse und Interpretation der Transkriptionsprofile

## 3) Charakterisierung von infektionsassoziierten Genen bei oralen *C. albicans*

### Infektionen

- Charakterisierung neuer, virulenzassoziiierter Gene
- Erstellung von knock-out Mutanten
- Untersuchung der Mutanten
- Analyse der Genprodukte