

1. Einleitung

1.1 Pathogene Pilze

Pilze gehören zu den ältesten und am weitesten verbreiteten Organismen auf der Erde. So lassen sich die ersten eindeutigen Pilzformen als Fossile bereits im Kambrium (vor ca. 500 Millionen Jahren) in den Schalen von Meerestieren nachweisen (Becker *et al.*, 1994). Sie sind als heterotrophe Organismen an fast allen Standorten zu finden, an denen gleichzeitig andere Organismen leben oder gelebt haben. Sie spielen in der Natur eine wichtige Rolle als Zersetzer vieler organischer, insbesondere pflanzlicher Stoffe (z.B. Cellulose und Lignin) und werden schon seit Jahrhunderten vom Menschen genutzt. Verwendung finden sie dabei sowohl als direktes Nahrungsmittel (z.B. der Kulturchampignon (*Agaricus bisporus*) oder der in Japan häufig verzehrte Shii-take (*Lentinus edodes*)), aber auch biotechnologisch in Form von z.B. Alkohol produzierenden Pilzen wie der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) oder Antibiotika produzierenden Pilzen wie *Penicillium chrysogenum* (Elander und Lowe, 1992).

Unter den geschätzten mehr als 1,5 Millionen Pilzarten (Hawksworth, 2001) gibt es aber neben den für den Menschen nützlichen Pilzen auch eine Reihe von pathogenen Spezies. So werden z.B. 135 der 162 wichtigsten Pflanzenkrankheiten durch Pilze hervorgerufen (von Denffer *et al.*, 1983), was zu jährlichen Ernteaussfällen in der Landwirtschaft von 8-10 % führen kann (Weber, 1993). Neben den Pflanzen sind weiterhin vor allem andere ektotherme Organismen wie Insekten, Fische oder Amphibien von Pilzinfektionen betroffen. Pilzinfektionen sind an dem weltweiten Rückgang der Amphibienpopulationen beteiligt (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 1999) und Pilze sind typische Pathogene für z.B. Milben (van der Geest *et al.*, 2000). Des Weiteren wird spekuliert, ob Pilzinfektionen auch an dem weltweiten Rückgang der Korallenriffe beteiligt sein könnten (Rosenberg und Ben-Haim, 2002).

Pilzinfektionen bei Säugetieren sind hingegen eher selten. So sind ca. 150 Arten beschrieben, die Krankheiten bei Säugetieren verursachen können, aber nur ein paar davon sind häufige Pathogene (Kwong-Chun und Bennett, 1992). Neben oberflächlichen Infektionen der Haut und Schleimhäute durch *Candida* sp. oder durch Dermatophyten wie *Trichophyton* sp., werden invasive Infektionen beim Menschen in

Europa vor allem durch *Candida*- und *Aspergillus*-Arten hervorgerufen (Kullberg und Oude Lashof, 2002). Dabei können die Pilze in tiefere Gewebsschichten vordringen, das Blutsystem erreichen und im ganzen Körper verbreitet werden (systemische Infektion). Allerdings hat sich in den letzten 20 Jahren die Epidemiologie von invasiven Pilzinfektionen verändert, so dass neben den *Candida*-Arten auch weitere Infektionen mit Hefepilzen wie *Trichosporum* sp. oder *Cryptococcus gattii* und neben den *Aspergillus*-Arten auch weitere Schimmelpilze wie Zygomyceten, *Fusarium* sp. oder *Scedosporium* sp. auftreten können (Nucci und Marr, 2005).

Bei den häufigen humanpathogenen Pilzen muss weiterhin zwischen endogenen, zur normalen mikrobiellen Flora des Menschen gehörenden Pilzen wie *Candida* sp. und *Malassezia* sp. (Ashbee *et al.*, 2002) und Pilzen, die über die Umwelt aufgenommen werden wie *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Sporothrix schenckii* unterschieden werden (Casadevall, 2005). Die meisten von den letzteren Pilzen leben im Boden und benötigen keinen tierischen Wirt zum Überleben. Zu dieser Gruppe gehört außerdem *Aspergillus fumigatus*, der als häufigster Pilz in der Luft nachgewiesen werden kann und der neben einer saprophytischen Lebensweise auch Eigenschaften eines typischen Humanpathogenen aufweist (Tekaiia und Latge, 2005).

Obwohl, wie oben bereits erwähnt, Pilzinfektionen beim Menschen eher selten sind, hat die Inzidenz in den letzten 20 Jahren deutlich zugenommen (Wilson *et al.*, 2002; Nucci und Marr, 2005). So konnte für das Jahr 1998 in den USA eine Inzidenz für die vier häufigsten systemischen Pilzinfektionen Candidose, Aspergillose, Cryptococcose und Histoplasmose von 306 pro 1 Millionen US-Bürger errechnet werden (Wilson *et al.*, 2002). Die Gesamtkosten für die Behandlung dieser Infektionen lagen dabei 1998 in den USA bei 2,6 Milliarden US-Dollar. Dies entsprach einer Summe von 31.200 US-Dollar pro Patient (Wilson *et al.*, 2002). Da hierbei die Candidose mit 75 % aller Fälle den mit Abstand größten Teil ausmachte (Wilson *et al.*, 2002), ist ein besseres Verständnis der Mechanismen einer *Candida*-Infektion nicht nur im Interesse des einzelnen betroffenen Patienten, sondern auch in gesundheitsökonomischer Hinsicht von besonderer Bedeutung. Mit der Erforschung von *Candida*-Infektionen wird vielfach die Hoffnung verbunden, neue Antimykotika-Angriffspunkte zu entdecken.

1.2 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Die zu den Ascomyceten gehörende Gattung *Candida* umfasst ca. 150 Arten. Die meisten Arten sind jedoch nicht pathogen für den Menschen, so dass man heute von nur ca. 13 Arten ausgeht, die Erkrankungen beim Menschen hervorrufen können (Calderone, 2002b).

Der prominenteste Vertreter der Gattung *Candida* ist *C. albicans*. Obwohl die mit *C. albicans* assoziierten Krankheiten, wie z.B. Soor (orale Infektion), seit Hippokrates (um 400 v. Chr.) bekannt sind, wurde die Beziehung zwischen dem Pilz und der Krankheit erst 1846 beschrieben (Berg, 1846) und der *Nomen conservandum* (*Candida albicans* [Robin] Berkhout 1923) wurde erst 1954 offiziell anerkannt (Calderone, 2002a).

1.2.1 Epidemiologie von *Candida*-Infektionen

Candida-Arten (inklusive *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata*) gehören beim gesunden Menschen zur normalen mikrobiellen Flora der Haut und Schleimhäute und können - je nach Art der Studie - bei bis zu 71 % der Gesamtbevölkerung nachgewiesen werden (Ruhnke, 2002). Den größten Anteil macht dabei *C. albicans* aus, der in über 70 % der positiven Proben nachgewiesen werden kann (Ruhnke, 2002).

Als Kommensale ist *C. albicans* normalerweise harmlos. Wird jedoch das Gleichgewicht der mikrobiellen Flora verändert oder ist das Immunsystem des Menschen geschwächt, so kann *C. albicans* die mikrobielle Flora überwachsen und es kann zu Krankheitssymptomen kommen. Grundsätzlich müssen hierbei zwei Formen unterschieden werden: oberflächliche Infektionen der Haut und Schleimhäute und invasive Candidosen, bei denen der Pilz in tiefere Gewebsschichten vordringt, das Blutsystem erreichen kann und somit im ganzen Körper verbreitet werden kann (systemische Candidose).

Oberflächliche Infektionen der Schleimhäute sind häufig bei immunsupprimierten Personen zu finden und umfassen chronische atropische Stomatitiden, sowie chronische mucocutane und vulvovaginale Candidosen. Weiterhin treten Infektionen des Oropharynx oder anguläre und exfoliative Cheilitis besonders bei HIV-positiven

Patienten auf (de Repentigny *et al.*, 2004). Die Infektionen der Schleimhäute werden zu 77-100 % durch *C. albicans* verursacht (Fidel und Sobel, 1996; de Repentigny *et al.*, 2004). Es wurden aber auch Infektionen mit anderen *Candida*-Spezies wie *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* und *C. parapsilosis* beobachtet. Diese können entweder alleine oder in Kombination mit *C. albicans* oder anderen *Candida*-Spezies auftreten.

Bei den invasiven oder systemischen Candidosen sieht das Erregerspektrum ähnlich aus wie bei den oberflächlichen Infektionen. Auch hier ist *C. albicans* das häufigste Pathogen. Allerdings ist in den letzten Jahren ein starker Anstieg an Infektionen mit *C. glabrata* zu verzeichnen (Abi-Said *et al.*, 1997; Baddley *et al.*, 2001). Die Anzahl der invasiven Candidosen hat sich in den 1980er und 1990er Jahren verdoppelt, wobei die Inzidenz in den letzten 10 Jahren stabil bis leicht steigend war (Morgan, 2005). Heute werden *Candida*-Arten in den USA am vierthäufigsten bei nosokomialen Blutinfektionen nachgewiesen (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Bei Patienten der Intensivstationen liegen *Candida*-Arten sogar an dritter Stelle der isolierten Erreger bei Blutinfektionen (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Weiterhin sind *Candida*-Infektionen die dritthäufigste Ursache für Infektionen des Harnapparates in Europa (Bouza *et al.*, 2001) und sie sind für 13,2 % aller intra-abdominalen Infektionen verantwortlich (Santos *et al.*, 2003). Die Mortalität bei Blutinfektionen mit *Candida*-Arten ist die höchste aller Blutinfektionen. Bei einer Neutropenie kann die Mortalität mehr als 50 % betragen (Kullberg und Oude Lashof, 2002). Aber auch nach Stammzelltransplantationen, bei der Blutinfektionen mit *Candida* sp. nur 4 % ausmachen, liegt die Mortalität bei 42 % (Ortega *et al.*, 2005). In einer Studie wurde die Mortalität im Zusammenhang mit dem Alter betrachtet. So lag die Mortalität einer Blutinfektion mit *Candida* bei Erwachsenen mit 40 % fast doppelt so hoch wie bei Kindern (22 %) (Pappas *et al.*, 2003).

1.2.2 Prädisponierende Faktoren einer *Candida*-Infektion

Sehr viele Publikationen haben sich mit den prädisponierenden Faktoren einer *Candida*-Infektion auseinandergesetzt. Zu den quantitativ wichtigsten Faktoren zählen dabei (neben einer Kolonisation mit *Candida* sp.) vor allem eine Behandlung mit Antibiotika und das Vorhandensein eines zentralen Venenkatheters (Wey *et al.*, 1989). Weitere Faktoren, die alle eine *Candida*-Infektion begünstigen können, sind

(Eggimann *et al.*, 2003): Blasenkatheter, Neutropenie, Diarrhö, parenterale Ernährung, der Gebrauch von Protonenpumpenhemmern, gastrointestinale Blutungen, operative Eingriffe (insbesondere Transplantationen), Gebrauch von Steroiden, Chemotherapie, multiple Transfusionen, Nierenversagen mit anschließender Dialyse bzw. Azotämie (Kullberg und Oude Lashof, 2002), mechanische Beatmung, eine lange Krankenhausverweildauer, stark erniedrigtes Geburtsgewicht bei Neugeborenen, das Alter (hohes Alter oder Neugeborene) und die Schwere (hoher APACHE-Wert) einer möglichen Grunderkrankung (Kauffman, 2006). Weiterhin sind vorangegangene Infektionen (z.B. mit HIV oder dem Cytomegalovirus CMV), Verbrennungen, Autoimmunkrankheiten, weibliches Geschlecht und eine Radiotherapie als prädisponierende Faktoren zu nennen (Mavor *et al.*, 2005).

Interessanterweise kann auch eine antifungale Therapie ein prädisponierender Faktor sein. So konnte gezeigt werden, dass eine Fluconazol-Prophylaxe das Auftreten von Infektionen mit *C. krusei* begünstigt (Abi-Said *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite ist aber auch das Ausbleiben einer antifungalen Prophylaxe als prädisponierender Faktor zu sehen (Pelz *et al.*, 2001).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass schwere *Candida*-Infektionen nicht mehr als seltene Infektionen zu betrachten sind, die hauptsächlich immunsupprimierte Personen betrifft, sondern dass heute alle Patienten betroffen sein können, insbesondere solche, die bereits schwere Grunderkrankungen vorweisen, welche eine aggressive Therapie erforderlich machen (Eggimann *et al.*, 2003).

1.2.3 Der Infektionsprozess und das Infektionsspektrum einer invasiven *C. albicans*-Infektion

Da *C. albicans* nach wie vor die dominierende Spezies der Gattung *Candida* ist, die invasive Candidosen hervorruft und da alle Experimente dieser Arbeit ausschließlich mit verschiedenen *C. albicans* Stämmen durchgeführt wurden, wird im Folgenden hauptsächlich auf Untersuchungen eingegangen, bei denen *C. albicans* im Mittelpunkt stand. Aus diesem Grund ist im Folgenden – wenn nicht anders angegeben – mit „*Candida*“ immer *C. albicans* gemeint.

1.2.3.1 Der Weg in das Blut

Wie oben bereits erwähnt gehört *C. albicans* zur normalen mikrobiellen Flora der Haut. Als Kommensale wird das Wachstum zum Einen durch die mikrobielle Flora und zum Anderen durch das Immunsystem des Menschen kontrolliert. Prinzipiell gibt es zwei mögliche Wege für *Candida*-Zellen in das Blut zu gelangen: 1. Der natürliche Weg durch Penetration von Epithelzellen und 2. Der künstliche Weg durch Verletzungen der natürlichen Barrieren des Menschen (traumatisch oder iatrogen).

Die Frage, ob die natürliche Infektion über die Haut oder den Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) erfolgt, ist bis heute nicht abschließend geklärt. In einer Übersichtsarbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass mehr Daten für den Gastrointestinaltrakt als Hauptinfektionsort sprechen als für die Haut (Nucci und Anaissie, 2001). So wurde z.B. in einem Selbstversuch von Krause *et al.* eine Fungämie und eine Fungurie nach einer oralen Aufnahme einer *Candida*-Suspension diagnostiziert (Krause *et al.*, 1969). Weiterhin treten systemische *Candida*-Infektionen gehäuft im Zusammenhang mit Läsionen des Darms auf (Eras *et al.*, 1972; Andrutis *et al.*, 2000). Weitere Daten, die für den GI-Trakt als natürliche Infektionsquelle sprechen, sind das Auftreten von disseminierten Candidosen bei einer Protein-Mangelernährung, die zu dünnen keratinösen und mukösen Schichten des Darmepithels führt (Takahashi *et al.*, 2003), sowie die Tatsache, dass das Immunsystem des Darms eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der ersten Schritte einer Infektion spielt (Bai *et al.*, 2004). Eine Ausnahme, die die Haut als natürliche Infektionsquelle annimmt, sind Infektionen mit *C. parapsilosis*, da diese vermehrt bei Patienten mit einem zentralen Venenkatheter auftreten (Abi-Said *et al.*, 1997).

Obwohl heute allgemein angenommen wird, dass der GI-Trakt den Hauptursprungsort für systemische Candidosen darstellt, kennt man immer noch nicht den exakten Mechanismus der Infektion. In der Maus ist *C. albicans* in der Lage den gesamten Darmbereich zu besiedeln, wird aber gehäuft an der Kardium-Atrium Grenze (Übergang vom keratinisiertem zu glandulärem Epithel) gefunden (Cole *et al.*, 1996). Da *Candida*-Zellen auch häufig in Kavitäten gefunden wurden, die durch die Zerstörung der Mikrovilli-Schicht entstanden sind (Cole *et al.*, 1993), wird angenommen, dass extrazelluläre Proteasen zumindest eine partielle Rolle bei der Schädigung des Darmepithels spielen und somit der Pilz Zugang zum Blutsystem erhält (Naglik *et al.*, 2004). Es wird weiterhin angenommen, dass andere

Virulenzfaktoren von *C. albicans* wie sekretorische Lipasen und Phospholipasen, die Hefe-Hyph-Transition oder der Thigmotropismus eine Rolle bei der Penetration des Epithels spielen (Ghannoum, 2000; Hube *et al.*, 2000; Stehr *et al.*, 2004). Aber auch der Wirt spielt vermutlich eine Rolle beim Übergang des Pilzes in das Blut. So wird spekuliert, ob die Immunantwort des Wirtes *Candida* hilft, die mechanische Barriere des GI-Trakts zu überwinden (Claveau *et al.*, 2004). Induzierte Endocytose ist ein weiterer Mechanismus, der eventuell vom Pilz benutzt werden kann, um die Darmbarriere zu überwinden. Für epidermale und Endothelzellen ist dieser Mechanismus bereits beschrieben (Rotrosen *et al.*, 1985; Csato *et al.*, 1986; Jong *et al.*, 2001), und es liegen auch Daten vor, wonach Endocytosemechanismen auch bei Darmzellen zumindest *in vitro* möglich sind (F. Dalle, persönliche Mitteilung).

Zu den iatrogenen Wegen das Blutsystem zu erreichen gehören zunächst einmal medizinische Hilfsmittel. In einer Übersichtsarbeit von Kojic und Darouiche wurde zusammengefaßt, dass zentrale Venenkatheter, eine peritoneale Dialyse und implantierte kardiovaskuläre Hilfsmittel (z.B. Herzschrittmacher) die häufigsten Ursachen einer systemischen Candidose sind (Kojic und Darouiche, 2004). Ein besonderes Problem bei medizinischen Hilfsmitteln ist das Auftreten von Biofilmen, da diese so lange eine Infektionsquelle für *C. albicans* darstellen, bis die Hilfsmittel erneuert werden (Kojic und Darouiche, 2004).

Zu den iatrogenen Ursachen sind weiterhin alle Eingriffe von außen zu zählen, die die natürliche Barrierefunktion der Haut und Schleimhäute beeinträchtigen. Dazu gehören neben operativen Eingriffen die Behandlung mit Medikamenten (insbesondere Immunsuppressiva und Antibiotika). Problematisch sind vor allem Kombinationen aus z.B. Organtransplantation bei gleichzeitiger Immunsuppression. Besonders bei Lebertransplantationen kommt es zu erhöhten Infektionsraten mit *C. albicans* (Castaldo *et al.*, 1991; Paya, 2001; Ortega *et al.*, 2005). Operative Eingriffe können aber auch direkt zu einer intra-abdominalen Infektion führen, welche letztendlich eine systemische Candidose auslösen kann (Blinzler *et al.*, 1997).

Abschließend ist zu erwähnen, dass die Möglichkeit einer Infektion auch nach einem körperlichen Trauma gegeben ist (z.B. Polytrauma).

Sind die Pilzzellen erst einmal in der Blutbahn, so können sie verschiedene Organe des Körpers infizieren. Obwohl es Hinweise gibt, dass das lymphatische System

auch zur Verbreitung der *Candida*-Zellen im Organismus beitragen kann (Andruti et al., 2000), so ist die Blutbahn dennoch der Hauptverbreitungsweg. In experimentellen Blutinfektionen konnte gezeigt werden, dass die Pilzzellen innerhalb kürzester Zeit nicht mehr im zirkulierenden Blut nachgewiesen werden können. Dabei ist allerdings nicht klar, ob die *Candida*-Zellen vom Immunsystem eliminiert werden, oder ob sie z.B. an Endothelzellen innerhalb der Organe haften. So werden bei einer experimentellen Infektion der Maus bis zu 99 % aller injizierten Pilzzellen innerhalb von 5-15 min in der Leber und in der Lunge zurückgehalten (Baine et al., 1974; Iannini et al., 1977; Katz et al., 1991; Katz et al., 1992; Katz et al., 1993; Robert et al., 2000). Dabei ist eine große Anzahl der Pilzzellen noch lebensfähig und es konnte auch gezeigt werden, dass die Zellen an Endothelzellen innerhalb der Organe adhärirt waren (Sawyer et al., 1976). Je nach dem Ort des Eintritts in die Blutbahn kann das Verhältnis von *Candida*-Zellen in der Leber und der Lunge variieren. Wenn eine periphere Vene (z.B. ein zentraler Venenkatheter) der Eintrittsort ist, so werden doppelt so viele Pilzzellen in der Lunge wie in der Leber gefunden. Auf der anderen Seite ist die Leber stärker belastet, wenn eine mesenteriale Vene (z.B. wenn der GI-Trakt der Herkunftsort der *Candida*-Zellen ist) zuerst betroffen ist (Baine et al., 1974).

1.2.3.2 Der Weg aus dem Blut heraus

Wie *Candida*-Zellen aus dem Blut heraus und in die Organe hinein kommen ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Arbeiten von Filler et al. zeigen jedoch, dass Endothelzellen hierbei eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere wurden hierzu *in vitro* Versuche mit humanen umbilikalischen Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt und diese Arbeiten sind in einem Übersichtsartikel zusammengefasst worden (Clemons et al., 2000).

Der erste Schritt für eine erfolgreiche Evasion aus der Blutbahn ist die Adhäsion von *C. albicans* an Endothelzellen. Proteine der Als-Familie (Hoyer, 2001) und Hwp1 (Sundstrom, 2002) spielen hierbei eine zentrale Rolle. Nach der Adhäsion können die Pilzzellen in die Endothelzellen eindringen, indem sie ihre eigene Endocytose induzieren (Rotrosen et al., 1985; Filler et al., 1995; Phan et al., 2005). Anschließend migrieren die *Candida*-Zellen durch das Endothel und schädigen es dabei (Filler et al., 1995; Zink et al., 1996). Wie die Schädigung genau zustande kommt ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird aber vermutet, dass *C. albicans* Apoptose in den

Endothelzellen induzieren kann. Zumindest konnte dies bereits für die Interaktion von *C. albicans* mit Makrophagen und Neutrophilen gezeigt werden (Rotstein *et al.*, 2000; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003; Gasparoto *et al.*, 2004) und ein weiterer humanpathogener Pilz, *Paracoccidioides brasiliensis*, kann ebenfalls in Epithelzellen Apoptose induzieren (Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Durch den Verlust der endothelialen Zellintegrität kommt es anschließend zu einer Freilegung der subendothelialen Basalmembran, an die wiederum neue *C. albicans* Zellen binden können, was den Austritt aus den Blutgefäßen erleichtert (Klotz und Maca, 1988).

Die Endothelzellen können ihrerseits aber auch auf die *C. albicans* Infektion reagieren indem sie Interleukine (u.a. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 und Prostacyclin), Leukocyten-Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1) und das vasculäre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) ausschütten (Clemons *et al.*, 2000). Wenn diese Antwort dazu führt, dass ausreichend Leukozyten an den Infektionsort rekrutiert werden, können die Immunzellen die Pilzzellen abtöten und somit den Infektionsprozess stoppen.

Eine Besonderheit ergibt sich bei einer *Candida*-Infektion des Zentralnervensystems (ZNS). Um in das ZNS zu gelangen, muss zunächst die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden. Diese Schranke setzt sich aus speziellen mikrovaskulären Endothelzellen zusammen, die den transzellulären Flux stark limitieren (Rubin und Staddon, 1999). Interessanterweise ist *C. albicans* in der Lage *in vitro* die Blut-Hirn-Schranke zu passieren ohne dabei die Integrität der Endothelzellen zu beeinträchtigen (Jong *et al.*, 2001).

1.2.3.3 Das Infektionsspektrum von *C. albicans*

Wie oben bereits erwähnt sind bei experimentellen Infektionen der Maus die Leber und die Lunge die ersten Organe, in denen man *Candida*-Zellen finden kann. Später werden auch die Milz, das Herz und die Nieren befallen (Odds, 1988). Prinzipiell kann nach einer experimentellen Infektion der Maus jedes Organ befallen sein. Die Organe, welche allerdings am häufigsten betroffen sind, sind die Niere, das ZNS und das Herz (Tuite *et al.*, 2004). Die höchsten Zellzahlen können 1-2 Tage nach einer Infektion in der Niere nachgewiesen werden. Neuere Ergebnisse zeigen, dass hierfür

vermutlich das Ausbleiben einer NF- κ B vermittelten inflammatorischen Antwort in der Niere verantwortlich ist (Choi *et al.*, 2001).

Vergleichbar mit der Infektion der Maus können auch beim Menschen fast alle Organe von einer systemischen *C. albicans* Infektion betroffen sein. So können folgende Krankheitsbilder aus einer *C. albicans* Infektion resultieren: Candidurie (Infektion der Harnapparates), Peritonitis (intra-abdominale Infektion), chronisch disseminierende Candidosen (Infektionen der Leber, Milz und manchmal auch der Niere), Endokarditis, Perikarditis und/oder Myokarditis (Infektionen des Herzens), Thrombophlebitis (oberflächliche Venenthrombosen), Endophthalmitis (Infektion des Auges), Meningitis (Infektion des ZNS), Pneumonie (Infektion der Lunge), Osteomyelitis und Arthritis (Infektionen der Knochen und Gelenke) (Filler und Kullberg, 2002). Diese Krankheitsbilder treten jedoch nicht alle gleichmäßig auf. So sind einige, wie z.B. durch *C. albicans* hervorgerufene Pneumonien, sehr selten.

Die Reihenfolge, in der die einzelnen Organe nach einer Infektion befallen werden, hängt primär mit dem Eintrittsort (periphere oder mesenteriale Vene, s. o.) aber auch mit der Infektiösität des *Candida*-Stamm (s. u.) zusammen. So konnte nach einer intraperitonealen Infektion der Maus beobachtet werden, dass zunächst die Leber, der Pankreas und die Milz befallen waren, da hier die Organkapseln direkt aus der Bauchhöhle heraus durchdrungen werden konnten (Kretschmar *et al.*, 1999a). Erst später konnten auch Pilzzellen in der Lunge und im Herzen nachgewiesen werden und erst nach 24 h wurden auch Pilze im ZNS und in der Niere gefunden.

1.2.4 Infektionen der Leber

Eine besondere Bedeutung bei systemischen *C. albicans* Infektionen kommt der Leber zu. Die Leber stellt das erste Organ dar, welches nach einer natürlichen Infektion über den GI-Trakt von *Candida*-Zellen befallen wird. Daher ist die Leber für den Organismus auch die erste Barriere, um hämatogene *Candida*-Infektionen zu kontrollieren.

Viele Arbeiten haben die *Candida*-Leber Interaktion mit perfundierten Organen untersucht (Sawyer *et al.*, 1976; Schwocho und Moon, 1981; Sawyer, 1988; Sawyer *et al.*, 1990). Dabei zeigte sich, dass bei der initialen Interaktion die Kupfferzellen (Makrophagen der Leber) nur einen geringen Einfluss auf die Adhäsion von *C. albicans* haben. Somit vermutet man, dass die Pilzzellen primär an Endothelzellen

innerhalb der Leber adhären (Sawyer *et al.*, 1976). Zumindest *in vitro* konnte schon gezeigt werden, dass *Candida* in der Lage ist, an humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVEC) zu adhären (Rotrosen *et al.*, 1985; Filler *et al.*, 1995). In der Leber konnte die Adhäsion von *Candida* durch die Zugabe von Serum erhöht werden (Schwocho und Moon, 1981). Möglicherweise können die Pilzzellen durch die Opsonisierung auch an Fc-Rezeptoren auf Kupferzellen binden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass filamentöse *Candida*-Zellen effizienter in der Leber zurückgehalten werden als Hefezellen, was auf eine stärkere Interaktion der Hyphen/Pseudohyphen mit der Leber im Vergleich zu Hefezellen hindeutet (Iannini *et al.*, 1977).

Als erste Barriere besonders für die frühe Infektion kann die Leber auch eine effiziente inflammatorische Antwort hervorrufen, die für den weiteren Verlauf der Infektion entscheidend ist (Odds, 1994; Correa *et al.*, 2004). Es werden dabei inflammatorische Mediatoren wie proteolytische Enzyme, pro-inflammatorische Cytokine, Nitritoxid und reaktive Sauerstoffspezies ausgeschüttet, die lokale und systemische Effekte nach sich ziehen können (Blasi *et al.*, 1994; Sherlock, 1995). Die Leberfunktion basiert dabei auf der integrierten Aktivität von hepatischen und nicht-hepatischen residierenden (z.B. Kupferzellen) und immigrierenden (z.B. Neutrophile) Zellen (Sherlock, 1995; Correa *et al.*, 2004). Aktuelle Daten von Renna *et al.* zeigen, dass *C. albicans* dazu in der Lage ist, Apoptose in Hepatocyten auszulösen (Renna *et al.*, 2006). Dies führt zu einer Dysintegrität der Leber, was wiederum den Infektionsverlauf begünstigt.

Besonders häufig und problematisch sind systemische Candidosen nach einer Lebertransplantation. So liegt die Inzidenz einer invasiven Candidose nach einer Lebertransplantation mit 4-42 % deutlich höher als bei anderen Transplantationen (Patel und Paya, 1997). Dies hängt mit der langen und komplizierten Operation zusammen (Winston *et al.*, 1995) und wird durch die Immunsuppression bei gleichzeitiger Beeinträchtigung des retikuloendothelialen Systems der Leber begünstigt (Stone *et al.*, 1975; Kupiec-Weglinski und Busuttill, 2005).

Weiterhin wurden auch Leberabzesse mit *C. albicans* bei Patienten gefunden, die eine Grunderkrankung wie Diabetes mellitus oder eine Schädigung der Leber durch z.B. Alkoholkonsum aufwiesen (Tsai *et al.*, 2006). Eine mögliche Ursache für das Auftreten von Leberinfektionen nach einer Schädigung ist vermutlich die erhöhte Konzentration an freiem Eisen in dem Organ (Bullen *et al.*, 2006).

Schließlich kann die Infektionen der Leber auch durch eine allgemeine intra-abdominelle Pilzinfektion hervorgerufen werden. Dies geschieht insbesondere nach der Perforation des Gastrointestinaltrakts, nach Peritonealdialysen und bei einer hämorrhagisch nekrotisierenden Pankreatitis (Boos *et al.*, 2005).

1.2.5 Infektionsmodelle

Um die grundlegenden Mechanismen einer *C. albicans* Infektion zu verstehen, stehen prinzipiell drei verschiedene Modell-Typen zur Verfügung: *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo*.

Das einfachste Modell ist hierbei das *in vitro* Modell. Hier können über Interaktionen mit einzelnen Wirtszellen (Rotrosen *et al.*, 1985; Filler *et al.*, 1995; Lorenz *et al.*, 2004) bis hin zu dreidimensionalen *in vitro* Modellen wie dem rekonstituierten humanen Epithel (RHE) (Schaller *et al.*, 1998), einzelne Komponenten einer Infektion untersucht werden.

Da diese Modelle aber nur unzureichend die Bedingungen einer *in vivo* Situation widerspiegeln, wurde durch die Etablierung von *ex vivo* Modellen versucht, der *in vivo* Situation so nah wie möglich zu kommen. In den 1970er und 1980er Jahren wurde die Interaktion von *Candida* Zellen mit perfundierten Organen *ex vivo* / *in situ* untersucht (Sawyer *et al.*, 1976; Schwocho und Moon, 1981; Sawyer, 1988; Sawyer *et al.*, 1990). In letzter Zeit wurde zudem die Interaktion von *C. albicans* mit frischem humanen Blut *ex vivo* analysiert (Fradin *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 2005).

Das häufigste Infektionsmodell für eine *C. albicans* Infektion ist aber nach wie vor die Injektion von Pilzzellen in die Schwanzvene von Mäusen (Spellberg *et al.*, 2005). Hierbei werden allerdings in der Regel nur die Überlebensrate und die Organbelastung der infizierten Tiere mit Pilzzellen bestimmt. Ein besonderes Problem bei diesem intravenösen Infektionsmodell ist, dass die Pilzzellen nicht aktiv durch Gewebe penetrieren müssen, um die Blutbahn zu erreichen, und dass das Ergebnis einer solchen Infektion mit der Größe des eingesetzten Inokulums variiert (Odds *et al.*, 2000).

Um aber speziell die Invasion von *Candida* Zellen in Wirtsgewebe untersuchen zu können wurden Modelle entwickelt, die dieser Fragestellung nachgehen können. Dazu gehören einschichtige Epithelzellen, das oben genannte RHE, die chorioallantoische Membran von Hühnerembryos und die intraperitoneale (i.p.)

Infektion der Maus (Farrell *et al.*, 1983; Schaller *et al.*, 1998; Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b; Gow *et al.*, 2003).

1.3 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Die beiden Begriffe „Pathogenität“ und „Virulenz“ sind nicht immer klar definiert und werden häufig synonym verwendet. Eine gängige Definition ist aber, dass die Pathogenität die Fähigkeit eines Mikroorganismus beschreibt, bei einem spezifischen Wirtsorganismus Krankheitssymptome hervorzurufen. Pathogenität ist artspezifisch und genetisch fixiert und gibt damit eine qualitative Eigenschaft eines Mikroorganismus wieder. Im Gegensatz dazu beschreibt die Virulenz den Grad der Pathogenität. Sie ist stammspezifisch und messbar, so dass quantitative Aussagen möglich werden.

Einen Pathogenitätsfaktor bei einem kommensalen Mikroorganismus wie *C. albicans* zu definieren ist sehr schwierig und auch die Frage, was einen Virulenzfaktor von *Candida* ausmacht, wird häufig diskutiert (Haynes, 2001; Odds, 2003). Dennoch sollen im Folgenden einige Virulenzfaktoren von *C. albicans* beschrieben werden, deren Beteiligung an der Infektion nachgewiesen oder sehr wahrscheinlich ist.

1.3.1 Adhäsion

Wie bereits oben angedeutet, spielt die Adhäsion von *C. albicans* an Wirtsgewebe oder an die Oberflächen von medizinischen Hilfsmitteln eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer Infektion. Zu diesem Zweck exprimiert *C. albicans* so genannte Adhäsine auf seiner Zelloberfläche, die es dem Pilz erlauben, Biofilme auszubilden und an Endothelzellen und Organe während einer systemischen Infektion zu binden (Sundstrom, 1999; Calderone und Fonzi, 2001; Nobile *et al.*, 2006). Die meisten Adhäsine sind Glykoproteine und umfassen unter anderem die Als-Familie und das Protein Hwp1 (Staab *et al.*, 1999; Hoyer, 2001).

Die Als-Proteinfamilie (*Agglutinin-Like-Sequence*) wird durch acht Gene (*ALS1-7* und *ALS9*) kodiert. *ALS8* wurde zunächst als ein weiteres Gen angesehen, es stellte sich jedoch heraus, dass es sich hierbei um ein Allel von *ALS3* handelt (Zhao *et al.*,

2004). Alle Als-Proteine enthalten als zentrales Motiv eine stark glykosylierte Tandem-Wiederholung. Die N-terminale Sequenz ist bei allen Proteinen hoch variabel und man nimmt an, dass diese Sequenz für die Interaktion mit dem Wirt verantwortlich ist (Sheppard *et al.*, 2004). Die ALS-Gene werden abhängig von der Wachstumsphase unterschiedlich exprimiert. So ist z.B. die Expression von ALS3 hyphenspezifisch während die Expression von ALS4 eng mit der Wachstumsphase von Hefezellen korreliert (Hoyer *et al.*, 1998a; Hoyer *et al.*, 1998b; Sheppard *et al.*, 2004).

Hwp1 ist ein hyphenspezifisches Protein der Zellwand, welches für eine kovalente Verknüpfung der *C. albicans* Zelle mit der Wirtszelle verantwortlich ist. Diese Verknüpfung wird durch die wirtseigene Transglutaminase katalysiert (Staab *et al.*, 1996; Staab *et al.*, 1999).

Interessanterweise zeigt eine aktuelle Arbeit von Albrecht *et al.* über regulatorische Aspartat-Proteasen, dass eine erhöhte Adhäsion auch ein Nachteil sein kann (Albrecht *et al.*, 2006). So scheint es auch bei *C. albicans* ähnlich wie bei *Plasmodium* oder *Toxoplasma* (Carruthers und Blackman, 2005) eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion zu sein, bestehende Verbindungen mit der Wirtszelle auch wieder lösen zu können.

1.3.2 Sekretorische hydrolytische Enzyme

Die Sekretion hydrolytischer Enzyme während einer Infektion ist eine weitere Virulenzeigenschaft von *C. albicans*. Hydrolytische Enzyme können bei der Zerstörung von Zelloberflächen, der Adhäsion, der Invasion, der Zerstörung von Immunfaktoren des Wirts und bei der Nährstoffgewinnung eine Rolle spielen (Hube und Naglik, 2001). In *C. albicans* umfassen die sekretorischen hydrolytischen Enzyme die Familien der sekretorischen Aspartat-Proteasen (Saps), der Phospholipasen und der Lipasen. Vergleichbar mit den Als-Familienmitgliedern haben auch bei den hydrolytischen Enzymen die einzelnen Mitglieder der drei Familien ähnliche Eigenschaften, sind aber auf bestimmte Wachstumsphasen und/oder spezifische Wirtsnischen spezialisiert.

Die am besten untersuchten hydrolytischen Enzyme umfassen die Mitglieder der sekretorischen Aspartat-Proteasen. Die SAP-Genfamilie umfasst 10 Mitglieder, deren

Expressionsprofile sich unter verschiedenen Bedingungen, in verschiedenen *in vivo* Modellen und in verschiedenen Candidose-Patienten unterscheiden (Monod und Borg-von Zepelin, 2002; Naglik *et al.*, 2003a; Naglik *et al.*, 2003b; Schaller *et al.*, 2003). So sind z.B. die Gene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* in Hyphen stärker exprimiert als in Hefezellen und werden für die Invasion in die Leber und den Pankreas während einer intraperitonealen Infektion der Maus benötigt (Felk *et al.*, 2002). Insbesondere *SAP5* wurde in diesem Modell in der Leber und der Niere als stark exprimiert identifiziert und in einem intravenösen Infektionsmodell konnte eine starke Expression von *SAP5* in der Niere nachgewiesen werden (Staib *et al.*, 2000). In dem intravenösen Infektionsmodell wurde zu einem späteren Zeitpunkt auch eine Expression von *SAP2* nachgewiesen, so dass spekuliert wird, dass Sap4, Sap5 und Sap6 für eine erfolgreiche Invasion in Wirtsgewebe benötigt werden, wohingegen Sap2 zu einem späteren Infektionszeitpunkt für die Nährstoffaufschließung verantwortlich ist (Staib *et al.*, 2000). Ein weiteres Indiz für die Bedeutung der sekretorischen Aspartat-Proteasen sind Versuche mit Pepstatin A, einem Aspartat-Protease-Hemmer. Appliziert man Pepstatin A Mäusen vor und während einer intranasalen oder intraperitonealen Infektion, so ist die Mortalitätsrate drastisch reduziert (Fallon *et al.*, 1997; Kretschmar *et al.*, 1999b). Da sich jedoch kein Effekt bei einer intravenösen Infektion zeigt, wird vermutet, dass extrazelluläre Proteasen besonders dort eine Rolle spielen, wo während des Infektionsprozesses eine physikalische Barriere des Wirts durchdrungen werden muss.

Phospholipasen sind die zweite Familie hydrolytischer Enzyme, denen eine Rolle beim Infektionsprozess von *C. albicans* zukommt. Phospholipasen werden von vielen pathogenen Mikroorganismen exprimiert (Ghannoum, 2000) und auch in *C. albicans* konnte Phospholipase A-, B-, C- und D-Aktivität nachgewiesen werden (Niewerth und Korting, 2001). Interessanterweise scheinen aber nur die Mitglieder der Phospholipase B-Familie (*PLB1-5*) extrazellulär zu sein (Mavor *et al.*, 2005). Plb1 scheint für den größten Teil der extrazellulären Phospholipase-Aktivität verantwortlich zu sein und die Expression von *PLB1* ist in Hefezellen und Pseudohyphen stärker als in Hyphen (Hoover *et al.*, 1998; Leidich *et al.*, 1998; Ghannoum, 2000). Eine $\Delta plb1$ -Mutante ist in ihrer Fähigkeit zur Penetration und in ihrer Virulenz stark reduziert (Leidich *et al.*, 1998). Weitere Hinweise, dass Phospholipasen eine wichtige Rolle bei der Infektion spielen, stammen von einer

Arbeit von Ibrahim *et al.* (1995). Hier konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* Isolate von Patienten mit einer disseminierten Candidose *in vitro* eine höhere Phospholipase-Aktivität aufwiesen als Isolate, die nur Kommensale sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein invasiver Stamm in einem Mausmodell mehr Phospholipase-Aktivität aufwies als ein nicht-invasiver Stamm (Ibrahim *et al.*, 1995).

Die dritte Familie der extrazellulären hydrolytischen Enzyme sind die Lipasen, die ebenfalls durch 10 Gene (*LIP1-10*) kodiert werden (Fu *et al.*, 1997; Hube *et al.*, 2000). Ähnlich wie die *SAP*-Gene werden auch die *LIP*-Gene in bestimmten Wachstumsphasen oder Infektionsorten differentiell exprimiert (Hube *et al.*, 2000; Stehr *et al.*, 2004; Schofield *et al.*, 2005). Bislang wurden aber keine Arbeiten beschrieben, in denen Mutanten von *LIP*-Genen hergestellt wurden, so dass eine Rolle der Lipasen bei einer Infektion noch nicht geklärt werden konnte.

1.3.3 Morphogenese und Invasion

C. albicans ist in der Lage vier distinkte Wachstumsformen auszubilden: Hefezellen, Pseudohyphen, Hyphen und Chlamydosporen. Dabei wurde zunächst angenommen, dass Pseudohyphen eine Zwischenstufe zwischen dem Hefe- und dem Hyphenwachstum sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass Pseudohyphen eine distinkte Entwicklungsform darstellen (Sudbery, 2001; Sudbery *et al.*, 2004). Chlamydosporen treten nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen auf und konnten nur selten *in vivo* beobachtet werden (Cole *et al.*, 1991) während die drei anderen Wachstumsformen alle *in vivo* beobachtet werden können. Man geht daher davon aus, dass sowohl Hefezellen als auch Pseudohyphen und Hyphen zu einer Infektion beitragen. So exprimieren alle drei Zelltypen ein unterschiedliches Arsenal an Virulenzfaktoren und es wird z.B. diskutiert, dass Hefezellen für die Disseminierung geeignet sind, während Hyphen eher eine Rolle bei der Organinvasion zukommt (Gow, 2002). *C. albicans* Zellen, die nicht in der Lage sind, unterschiedliche Morphologien auszubilden, sind avirulent in verschiedenen Infektionsmodellen. Dies konnte zumindest für Hefezellen (Lo *et al.*, 1997) und Pseudohyphen (Braun und Johnson, 1997) gezeigt werden, obwohl anzumerken ist, dass die in diesen beiden Arbeiten beschriebenen Mutationen pleiotrop sind, so dass neben der Morphogenese auch andere Eigenschaften des Pilzes betroffen sein

könnten. Eine neuere Arbeit zeigte jedoch, dass eine $\Delta hgc1$ -Mutante (G1-Cyclin) keine Hyphen mehr ausbilden kann, dennoch hyphenspezifische Gene wie *HWP1*, *ECE1* und *HYR1* exprimieren kann, und trotzdem in der Virulenz stark reduziert ist (Zheng *et al.*, 2004).

Obwohl also das Hyphenwachstum ein wichtiger Virulenzfaktor zu sein scheint, so ist eine Hyphe vermutlich nicht fähig, allein durch physikalischen Druck in Gewebe einzudringen. Arbeiten mit dem humanpathogenen Oomyceten *Pythium insidiosum* zeigten, dass der Turgor einer Hyphenzelle und der damit verbundene Druck, der auf ein Gewebe ausgeübt wird, nicht ausreichen, um in Gewebe einzudringen (Ravishankar *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2002). Und auch bei einem weiteren pathogenen Pilz, *Wangiella dermatitidis*, wird die Invasion in Agar bei steigender Agarkonzentration inhibiert (Brush und Money, 1999). Man geht also davon aus, dass Hyphen nur in Kombination mit sekretorischen Enzymen (s. o.) in der Lage sind, Gewebe zu penetrieren. Nichtsdestotrotz kommt der Aufrechterhaltung des invasiven Drucks während der Kolonisation solange eine Bedeutung zu, bis das umgebene Gewebe von den extrazellulären Hydrolasen destabilisiert wurde und somit die Hyphenspitze in das Gewebe eindringen kann (Ravishankar *et al.*, 2001).

Der Übergang vom Hefe- zum Hyphenwachstum unterliegt verschiedenen Faktoren. So begünstigen Temperaturen unter 35 °C und ein saurer pH-Wert das Hefewachstum, während erhöhte Temperaturen und ein neutraler bis alkalischer pH-Wert das Hyphenwachstum forcieren. Zellen der stationären Phase oder Zellen, die anaeroben Verhältnissen oder Stresssituationen ausgesetzt sind, neigen ebenfalls zur Hyphenbildung. Weitere Faktoren, welche die Hyphenbildung induzieren, sind Serumbestandteile (Feng *et al.*, 1999), ein hoher CO₂-Gehalt, Signalmoleküle des *Quorum sensing* (Enjalbert und Whiteway, 2005), Nährstoffmangel oder der Kontakt mit Oberflächen (Sherwood *et al.*, 1992; Kumamoto, 2005).

1.3.4 Metabolismus, Stress und pH

Metabolische Proteine als Virulenzfaktoren zu bezeichnen ist nicht immer schlüssig, da viele Proteine des Metabolismus von *C. albicans* auch bei nicht-pathogenen Pilzen wie *S. cerevisiae* vorkommen. In diesem Zusammenhang sollte man vielleicht besser von „Persistenzfaktoren“ (Lorenz und Fink, 2002) oder „Fitnessfaktoren“ (Muller *et al.*, 1999) sprechen, da metabolische Gene ein Überleben von *C. albicans*

im Wirt überhaupt erst ermöglichen. Weiterhin ist die metabolische Flexibilität gegenüber sich ändernden Bedingungen für das Überleben des Pilzes auf und im Wirt von entscheidender Bedeutung. Es ist somit auch nicht verwunderlich, dass Deletionen von metabolischen Genen oft zur Avirulenz führen (Navarro-Garcia *et al.*, 2001).

Da das Nährstoffangebot auch ein wichtiger Faktor für den Hefe-Myzel-Übergang ist, kommt u. a. dem Glukose-Metabolismus eine entscheidende Rolle als Persistenzattribut zu. Obwohl bisher wenig über den Glukose-Metabolismus bei *C. albicans* bekannt ist und sich die meisten Daten auf Arbeiten mit *S. cerevisiae* stützen, so konnte doch vor kurzem ein Glukose-Sensor in *C. albicans* identifiziert werden, der eine Rolle bei der Virulenz spielt (Brown *et al.*, 2006). Ähnliches gilt für den Stickstoff-Metabolismus. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Wahrnehmung und die Aufnahme von Aminosäuren während einer Infektion für eine volle Virulenz essentiell zu sein scheint (Martinez und Ljungdahl, 2004).

Neben diesen Makronährstoffen ist es weiterhin für den Pilz wichtig, Mikronährstoffe wahrnehmen und aufnehmen zu können. Dazu gehört vor allem die Aufnahme von Eisen. Wie oben bereits erwähnt, kann es zu Leberabzessen mit *C. albicans* nach einer vorangegangenen Schädigung der Leber kommen. Eine mögliche Ursache für diese Abzesse ist vermutlich eine erhöhte Eisenkonzentration im Lebergewebe aufgrund dieser Schädigung (Bullen *et al.*, 2006). Generell versucht der menschliche Wirt durch das Binden von freiem Eisen an Proteine im Körper ein Milieu zu schaffen, welches unvorteilhaft für das Wachstum von Mikroorganismen ist. Dieser Defensivmechanismus wird daher auch „Nährstoff-Immunität“ (*nutritional immunity*) bezeichnet (Weissman und Kornitzer, 2004). *Candida* besitzt daher ein hoch effizientes System zur Eisenaufnahme und die Deletion des hochaffinen Eisenpermease-Gens *FTR1* führt zur Avirulenz der Mutante (Ramanan und Wang, 2000).

Ein weiteres Virulenzattribut von *C. albicans* ist die Anpassung an verschiedene Stresssituationen. Ein Merkmal ist z.B. eine erhöhte Resistenz gegenüber Antimykotika, bei der Transporter wie Cdr1, Cdr2 und Mdr1 verstärkt exprimiert werden (Goldway *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997b). Um sich gegen reaktive Sauerstoffspezies während einer Phagozytose durch Neutrophile und Macrophagen zu schützen, können verschiedene *Candida*-Arten Antioxidantien wie 2,4-(Hydroxyphenyl)-Ethanol produzieren (Cremer *et al.*, 1999). Darüber hinaus

exprimiert *Candida* u. a. eine Katalase (*CAT1*) und die Superoxiddismutasen Sod1-6, um sich vor oxidativen Stress zu schützen. Aber auch die Mannane der Zellwand können vor oxidativem Stress schützen (Krizkova *et al.*, 2001). Flavohämoglobin hingegen schützt *C. albicans* vor nitrosativem Stress (Ullmann *et al.*, 2004). Die oxidative Stressantwort und weitere Stressantworten werden dabei über die stressaktivierte Proteinkinase Hog1 reguliert (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Enjalbert *et al.*, 2006).

Ein weiterer Virulenzmechanismus, welcher über die Außenwahrnehmung von *C. albicans* gesteuert wird, ist die Anpassung an unterschiedliche pH-Werte. *Candida* ist in der Lage, über den Rim101-Signaltransduktionsweg den extrazellulären pH-Wert wahrzunehmen und ein entsprechendes Transkriptionsprogramm zu starten. Eine Anpassung an den extrazellulären pH-Wert erlaubt es *Candida*, verschiedene Nischen des menschlichen Körpers zu besiedeln. So kann *C. albicans* sowohl bei leicht alkalischen Bedingungen im Blut als auch bei leicht sauren Bedingungen in der Vagina wachsen. Eine Inaktivierung des Signaltransduktionswegs durch eine Deletion des Transkriptionsfaktors Rim101 führt demnach auch zur Avirulenz (Davis *et al.*, 2000).

Die beiden bekanntesten Vertreter einer pH-abhängigen Expression sind dabei *PHR1* und *PHR2*. Diese beiden auch als pH-Marker bezeichneten Glykosidase-Gene werden entgegengesetzt reguliert: während *PHR1* bei neutralen bis alkalischen Bedingungen exprimiert wird, wird *PHR2* fast ausschließlich unter sauren Bedingungen exprimiert (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlschlegel und Fonzi, 1997). Entsprechend ihrer Expression sind die Mutanten dieser beiden Gene auch unterschiedlich virulent: während $\Delta phr1$ avirulent im systemischen Mausmodell (pH ~7,4) ist und keine Beeinträchtigung in einem vaginalen Infektionsmodell (pH ~4,5) zeigt, ist $\Delta phr2$ nur im sauren vaginalen Infektionsmodell avirulent, im alkalischen systemischen jedoch nicht (De Bernardis *et al.*, 1998).

1.4 Stammspezifische Unterschiede in der Virulenz von *C. albicans*

Wie bereits mehrfach angedeutet, spielen die wirtseigenen Faktoren eine wichtige Rolle für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion. Dennoch gibt es auch stammspezifische Faktoren des Pilzes, die im Zusammenhang mit der Virulenz und Invasivität von *C. albicans* stehen.

1.4.1 Populationsgenetik und stammspezifische Eigenschaften von *C. albicans*

Ende der 1970er und Anfang der 1980er Jahre wurde begonnen, verschiedene *C. albicans* Isolate systematisch phänotypisch zu charakterisieren (Warnock *et al.*, 1979; Odds und Abbott, 1980) und die gefundenen Phänotypen mit der Virulenz der einzelnen Isolate zu korrelieren. Dabei konnten Odds *et al.* zeigen, dass es keine Korrelation zwischen den Phänotypen von *C. albicans* Isolaten und der anatomischen Stelle, an der die Isolate gewonnen wurden, gibt (Odds *et al.*, 1983). Anfang der 1990er Jahre wurde die phänotypische Charakterisierung durch eine genotypische Charakterisierung (*fingerprinting*) ergänzt, so dass erstmals bestimmte phänotypische Eigenschaften einem Genotyp zugeordnet werden konnten. Arbeiten von Schmid *et al.* zeigten dabei, dass Gruppen von genetisch ähnlichen Stämmen gehäuft (bis zu 70 %) bei Patienten mit einer Candidose auftraten und dass diese Stämme auch häufig (bis zu 30 %) bei nichterkrankten Personen anzutreffen waren (Schmid *et al.*, 1990; Schmid *et al.*, 1992; Schmid *et al.*, 1993). Gleichzeitig konnte diesen Gruppen physiologische Eigenschaften wie eine erhöhte NaCl-Resistenz und eine erhöhte Adhäsion zugeordnet werden, so dass die Schlussfolgerung gezogen werden konnte, dass diese Gruppen aufgrund ihrer Genotypen und den damit verbundenen physiologischen Eigenschaften eine erhöhte Fitness sowohl als Kommensale als auch als Pathogen gegenüber anderen *C. albicans* Stämmen aufweisen und somit die dominanten ätiologischen Erreger aller Candidose-Formen darstellen (Schmid *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 1999).

Neben dem Vergleich von Phänotyp und Genotyp wurde über verschiedene Genotypisierungsverfahren vor allem versucht, Korrelationen zwischen dem Genotyp und der geographischen Herkunft (Soll und Pujol, 2003; Tavanti *et al.*, 2005) oder der anatomischen Infektionsstelle (Luu *et al.*, 2001; Tavanti *et al.*, 2005) zu finden. Luu *et*

al. konnten zeigen, dass es keine Korrelation zwischen der anatomischen Infektionsstelle und dem Genotyp gibt. Somit ist die Fähigkeit von *C. albicans* in den Blutkreislauf einzudringen bei vielen Stämmen weit verbreitet (Luu *et al.*, 2001). Gleichzeitig bestätigte dies die früheren phänotypischen Arbeiten von Odds *et al.* (Odds *et al.*, 1983). Arbeiten von Dalle *et al.* und Karahan *et al.* zeigten im Gegensatz dazu, dass es durchaus einen Zusammenhang zwischen der Invasivität und dem Genotyp eines *C. albicans* Stamms geben könnte (Dalle *et al.*, 2000; Karahan *et al.*, 2004). Mittels 25S Intron-Analyse konnte z.B. gezeigt werden, dass der Genotyp A häufiger im Blut anzutreffen war als an anderen anatomischen Stellen (Karahan *et al.*, 2004).

Neben diesen größeren *fingerprinting*-Studien mit z. T. mehreren hundert Isolaten, wurden in kleineren Studien spezifischere Korrelationen zwischen den Genotypen und Phänotypen von *C. albicans* Stämmen analysiert. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Homozygotie am Paarungstyp-Lokus (*mating type like (MTL) locus*) mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Azolen assoziiert ist (Rustad *et al.*, 2002). Eine weitere Arbeit zeigte, dass Heterozygotie am *MTL*-Lokus mit einem kompetitiven Vorteil und einer erhöhten Virulenz gegenüber homozygoten Stämmen verbunden ist (Lockhart *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu steht jedoch eine Arbeit von Ibrahim *et al.*, die zeigte, dass weniger der Paarungstyp als vielmehr die Ploidität der Stämme mit der Virulenz korreliert (Ibrahim *et al.*, 2005). Untersuchungen der Interaktion mit Makrophagen zeigten weiterhin, dass dem Karyotyp von *C. albicans* vermutlich eine Rolle bei der Virulenz zukommt (Tavanti *et al.*, 2006).

All diese Versuche über die Populationsgenetik auf phänotypische Eigenschaften wie die Virulenz oder Invasivität von *C. albicans* Stämmen zurückzuschließen, ergaben somit bislang ein sehr heterogenes Bild, welches finale Aussagen nur beschränkt zulässt.

1.4.2 Die *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 im direkten Vergleich und im Vergleich zu anderen Stämmen

Populationsgenetische Untersuchungen geben zwar einen guten Überblick über verschiedene Gruppen von *C. albicans* Stämmen wider, befassen sich in der Regel jedoch nicht mit individuellen Isolaten. Auf der anderen Seite gibt es jedoch eine Menge Arbeiten, die bestimmte Aspekte wie Virulenz, Protease-Aktivität oder

Invasion an distinkten *C. albicans* Stämmen untersuchen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass unterschiedliche *C. albicans* Stämme ein unterschiedliches Verhalten in ihren Invasioneigenschaften gegenüber Epithelzellen *in vitro* zeigten (Bartie *et al.*, 2004).

Der am besten untersuchte Stamm ist vermutlich *C. albicans* SC5314 (Gillum *et al.*, 1984). Dieses Patientenisolat aus den 1970er Jahren wurde als erstes für genetische Manipulationen verwendet (Fonzi und Irwin, 1993) und wurde auch für die Sequenzierung von *C. albicans* ausgewählt (Jones *et al.*, 2004). Da es bis vor kurzem keinen positiv selektierbaren Marker für molekularbiologische Arbeiten mit *C. albicans* gab (Wirsching *et al.*, 2000), wurden auch fast alle molekularbiologischen Arbeiten mit Stamm SC5314 bzw. mit dessen Ura⁻-Derivaten durchgeführt.

Dennoch gibt es auch andere *C. albicans* Stämme, die häufig für pharmakologische oder biochemische Arbeiten verwendet werden. Ein solcher Stamm ist ATCC10231. Dieses Isolat aus den Bronchien eines Patienten (<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>) stammt aus den 1960er Jahren und wurde bereits 1966 bei Infektionsversuchen mit Mäusen eingesetzt (Balish und Phillips, 1966; Phillips und Balish, 1966) und findet bis heute vor allem bei pharmakologischen Fragestellungen Verwendung (Feng *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2006). So konnte für Stamm ATCC10231 gezeigt werden, dass im Vergleich zu einem anderen virulenten Stamm (ATCC10261 (Wright *et al.*, 1992)) das Verhältnis der Enzymmenge von Sap2 zu Sap3 unterschiedlich ist (Smolenski *et al.*, 1997) und obwohl es sich bei Stamm ATCC10231 um ein Patientenisolat handelt, ist der Stamm im Gegensatz zum Stamm SC5314 in allen bisher getesteten Tiermodellen avirulent (Balish und Phillips, 1966; Phillips und Balish, 1966; Schmidt und Geschke, 1996). Zusätzlich zeigten Arbeiten von Kretschmar *et al.*, dass der Stamm ATCC10231 bei einer intraperitonealen Infektion der Maus nicht-invasiv ist, während Stamm SC5314 aus der Bauchhöhle tief in die parenchymalen Organe eindringen konnte (Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b). Stamm ATCC10231 war in diesem Infektionsmodell hingegen in der Lage, sekundär die Lunge, das Herz und die Niere zu infizieren. Im Gegensatz zu SC5314 konnte ATCC10231 aber nicht das ZNS infizieren (Kretschmar *et al.*, 1999a).

Genotypisch unterscheiden sich die beiden Stämme nur gering. So gehört nach einer MLST-Studie (*Multi Locus Sequence Typing*) von Tavanti *et al.* Stamm SC5314 zur Gruppe 1 während Stamm ATCC10231 zur Gruppe 2 gehört (Tavanti *et al.*, 2005).

Es konnte in dieser Arbeit aber keine Verbindung zwischen dem Genotyp und der klinischen Relevanz der beiden Stämme gezogen werden (Tavanti *et al.*, 2005). Somit konnten die Unterschiede in der Virulenz und Invasivität der beiden Stämme bisher nicht erklärt werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Invasivität von *C. albicans* ist ein nur unzureichend untersuchtes Gebiet. Insbesondere die Unterschiede zwischen invasiven und nicht-invasiven *C. albicans* Stämmen sind bisher nur wenig analysiert worden.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb versucht werden, invasionsassoziierte Gene in *C. albicans* zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollten auf molekularbiologischer Ebene *in vivo* Transkriptionsprofile nach einer intraperitonealen Infektion der Maus im zeitlichen Verlauf analysiert werden. Als zusätzliche Ergänzung der Analyse sollten Transkriptionsdaten aus einem zuvor etablierten *ex vivo* Infektionsmodell mit einbezogen werden. Daneben sollte die unterschiedliche Invasivität der *C. albicans* Stämme SC5314 (invasiv) und ATCC10231 (nicht-invasiv) mit phänotypischen und genotypischen Methoden analysiert werden.

Schließlich sollten Gene, die eine differentielle Expression in den Transkriptionsprofilen zwischen den beiden Stämmen aufweisen, näher charakterisiert werden.

