

---

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der  
Ludwigs-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Vergleichende Bewertung von Wirkstoff-Kandidaten vom Typ der  
Hemmer der sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap)  
von *Candida albicans* im Candida-Keratinoyzten-Adhärenz Assay  
und im Hautkonstrukt gestützten Modell  
der lokalisierten Kandidose**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Lydia Semlin  
aus  
Bernau b. Berlin

Jahr  
2013

---

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Claudia Borelli

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ernst Rainer Weissenbacher  
Prof. Dr. rer. nat. Frank Ebel

Mitbetreuung durch die  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. hum. biol. Burkard Summer  
Priv. Doz. Dr. med. Ronald Wolf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2013

---

Meinen Eltern gewidmet

In Gedenken an Prof. Dr. Hans-Christian Korting,  
der mir das Thema gab und mir während meiner Arbeit  
zu jeder Zeit zur Seite stand.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Vorwort.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeines .....</b>	<b>4</b>
2.1	Funktion der menschlichen Haut .....	4
2.2	Aufbau der Epidermis.....	5
2.3	Infektionen der Haut und Schleimhaut (Kandidose) .....	7
2.4	<i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ).....	8
2.5	Antimykotika.....	9
2.6	Virulenzfaktoren .....	10
2.6.1	Phänotypisches Switching .....	10
2.6.2	Dimorphismus.....	11
2.6.3	Adhäsion.....	12
2.6.4	Thigmotropismus.....	12
2.6.5	Hydrolytische Enzyme .....	12
2.7	Sekretorische Aspartatproteinasen (Sap).....	14
2.7.1	Bedeutung der Sap als Virulenzfaktor .....	14
2.7.2	Pepstatin und Pepstatin-Analoga als Inhibitoren sekretorischer Aspartatproteinasen .....	15
2.8	Ziel dieser Arbeit.....	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.1	Candida-Keratinozyten-Adhärenz-Assay .....	19
3.1.1	Prinzip.....	19
3.1.2	Primäre Keratinozyten .....	19
3.1.3	<i>C. albicans</i> (Wildtypstamm SC5314).....	20
3.1.4	Inhibitorlösungen.....	21
3.1.5	Candida-Keratinozyten-Adhärenz-Assay .....	22
3.2	Hautkonstrukt gestütztes Experiment.....	23
3.2.1	Hautkonstrukt und Medium .....	23
3.2.2	Sap-Inhibitorlösungen .....	23
3.2.3	Präparation und Synchronisation von <i>C. albicans</i> .....	24
3.2.4	Durchführung des Hautkonstrukt Experiments .....	25
3.2.5	Laktat-Dehydrogenase (LDH) Bestimmung.....	26
3.2.6	Fixierung und Einbettung .....	27
3.2.7	Präparation und Durchführung der lichtmikroskopischen Methode .....	28
3.3	Cytometric Bead Array (CBA).....	29
3.3.1	Prinzip.....	29
3.3.2	Vorbereitung der Lösungen zur Erstellung einer Standardkurve .....	29
3.3.3	Vorbereitung der Reagenzien .....	30
3.3.4	Probenaufbereitung und Messung .....	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
4.1	Candida-Keratinozyten-Adhärenz-Assay .....	32
4.1.1	Fluconazol.....	33
4.1.2	Pepstatin A .....	33
4.1.3	Inhibitor M.....	34
4.1.4	Inhibitor R.....	34
4.1.5	Einfluss des Lösungsmittel Methanol auf die Anlagerung von Candida-Zellen an Keratinozyten-Monolayer.....	35
4.2	Versuchsdesign und Laktat-Dehydrogenase Bestimmung im Hautkonstrukt Experiment .....	37

4.2.1	Fluconazol.....	38
4.2.2	Pepstatin A und Sap-Inhibitoren .....	39
4.3	Cytometric Bead Array (CBA).....	43
4.3.1	Sezernierte Interleukin-Mengen nach 24 Stunden Inkubationszeit im Hautkonstrukt-gestützten Experiment.....	44
4.3.2	Sezernierte Interleukin-Mengen nach 48 Stunden Inkubationszeit im Hautkonstrukt-gestützten Experiment.....	50
4.3.3	CBA Messung von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem-Faktor (GM-CSF) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) .....	54
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	55
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
5.1	Candida-Keratinozyten-Adhärenz Assay.....	57
5.2	Quantitative und qualitative Charakterisierung des Schadens durch <i>Candida albicans</i> am oralen Hautkonstrukt mittels LDH-Aktivität .....	59
5.3	Charakterisierung des Schadensausmaß am Hautkonstrukt aufgrund der Wirtsantwort durch Messung der Zytokin-Freisetzung mittels CBA .....	61
5.3.1	Interleukin 1 $\alpha$ .....	62
5.3.2	Interleukin 1 $\beta$ .....	63
5.3.3	Interleukin 8 .....	65
5.3.4	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor und Tumor-Nekrose-Faktor .....	65
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis eingesetzter Materialien .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>

## 1 Vorwort

Die vorliegende Arbeit behandelt ein Thema aus der Translationalen Pharmazie, die verwandt ist mit der Translationalen Medizin. Hauptbestandteil dieses Themenbereichs ist das *bedside-to-bench*- und *bench-to-bedside*-Prinzip. „Bedside to bench“ beschreibt die Umwandlung von am Patienten gewonnen Erkenntnissen in eine neue Herangehensweise im Labor. Im Gegensatz dazu beschreibt „Bench to bedside“ den Prozess bei dem aufgrund von neuen Erkenntnissen im Labor zum Beispiel durch das Verständnis von Vorgängen auf molekularer Ebene, eine Verbesserung des Therapieschemas oder eine innovativer Ansatz in der Behandlung erreicht wird.

Antimykotika werden vielfach nicht zur gezielten Therapie von Mykosen eingesetzt sondern auch prophylaktisch. Der damit einhergehende Selektionsdruck hat in den letzten Jahren zu einer Zunahme von Resistenzen geführt, allen voran gegenüber Fluconazol [88]. Die Entwicklung neuer Stoffe, die nicht die Abtötung des Keims allein zum Ziel haben, sondern die Virulenzfaktoren beeinflussen und somit keinen Selektionsdruck erzeugen sollte daher favorisiert werden.

Diese Arbeit umfasst die Charakterisierung potentieller Inhibitoren vom Typ der sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap) im Vergleich zu bereits etablierten antimykotisch wirksamen Substanzen.

## 2 Allgemeines

### 2.1 Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist, mit etwa zwei Quadratmetern, die größte direkt sichtbare Grenzfläche des menschlichen Körpers zur Umwelt. Es kommt ihr daher eine besondere Bedeutung als Schutz- und Abwehrorgan zu.

Zum einen schützt sie aufgrund ihrer Elastizität, Dehnbarkeit und Zugfestigkeit das Körperinnere vor mechanischen Einwirkungen und damit verbundenen Schäden. Außerdem verhindert sie durch *natural moisturizing factors* (NMF) [78] und ihrer spezialisierten Morphologie das Austrocknen des Körpers. Ihre Beschaffenheit sorgt auch dafür dass ein Großteil von Strahlungen vorwiegend reflektiert wird. Durch diese partielle Abschirmung, wird der Schaden somit begrenzt. Durch Mechanismen, wie die Melaninsynthese oder die Reparatur lichtbedingter DNS-Schädigungen können dennoch ausgelöste Schäden wieder repariert werden [115].

Die Haut stellt auch eine Penetrationsbarriere für zum Beispiel chemische Noxen, aber auch für Mikroorganismen dar. Durch die Spaltung von natürlich vorkommenden Fetten entsteht ein Haut-pH im sauren Bereich knapp unter 5 [56]. Die Bildung von antimikrobiell wirksamen Peptiden trägt auf natürliche Weise ebenfalls dazu bei, die Kolonisierung von pathogenen Keimen zu erschweren und die der residenten Flora zu favorisieren.

Trotz allem ist die Haut eine Eintrittspforte für diverse Pathogene und somit auch ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr. Eine Vielzahl an Zellen der angeborenen, unspezifischen Abwehr wie Mastzellen und Makrophagen übernehmen dabei die Aufgabe die Entzündungsreaktion einzuleiten. Durch Sekretion von Botenstoffen wird die unspezifische Immunabwehr schlussendlich durch die spezifische Abwehr in ihrer Funktion unterstützt. Langerhans Zellen sind vielfach in der Haut zu finden und dienen der Antigenpräsentation um vorkommende B- und T-Lymphozyten zu aktivieren, was wiederum die spezifische Abwehr von Gewebeschäden zum Ziel hat.

Die Haut dient der Reizaufnahme. Schmerz, Juckreiz, Temperatur und Druck werden durch mehr oder weniger hoch spezialisierte Organe wie Meißner-Tast-Körperchen, Merkelzellen, Pacini-Lamellenkörperchen aber auch freie Nervenendigungen aufgenommen und weitergeleitet [115].

Durch die vielen Blutgefäße dient die Haut auch der Temperaturregulation und als Flüssigkeitsspeicher. So kann durch Weitstellung der Gefäße mehr Wärme an die Umgebung abgegeben werden, der Körper wird dadurch gekühlt. Reicht dies nicht aus, so unterstützt die Schweißbildung weiter den Temperatúraustausch mit der Umgebung. Die Schweißsekretion dient außerdem auch dazu unerwünschte Substanzen aus dem Körper auszuscheiden. Die Haut ist somit auch ein Ausscheidungsorgan. Nicht zuletzt bedienen sich die heutzutage verwendeten Drogen-Schnelltests der Polizei dieser Funktion der Haut, in dem sie im Schweiß der Probanden vorkommende Abbauprodukte von illegalen Substanzen, wie Betäubungsmitteln nachweisen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** von der Polizei verwendeter Drogenschnelltest [126]

## 2.2 Aufbau der Epidermis

Die menschliche Haut ist aus drei Schichten aufgebaut: die äußerste Schicht bildet die Epidermis, die mittlere die Cutis, auch Dermis genannt und die innerste Schicht die sogenannte Subcutis. Die Haut kann je nach Lokalisation bis zu 1000µm dick sein und unterliegt als Proliferationsgewebe dauerhaften Veränderungen. Die Epidermis stellt das unmittelbar mit der Umwelt in Kontakt stehende Epithel dar. Sie ist keratinisiert, besitzt zahlreiche Nerven, jedoch keine eigenen Blutgefäße und wird daher durch Diffusion von der darunterliegenden Dermis mit Nährstoffen versorgt.

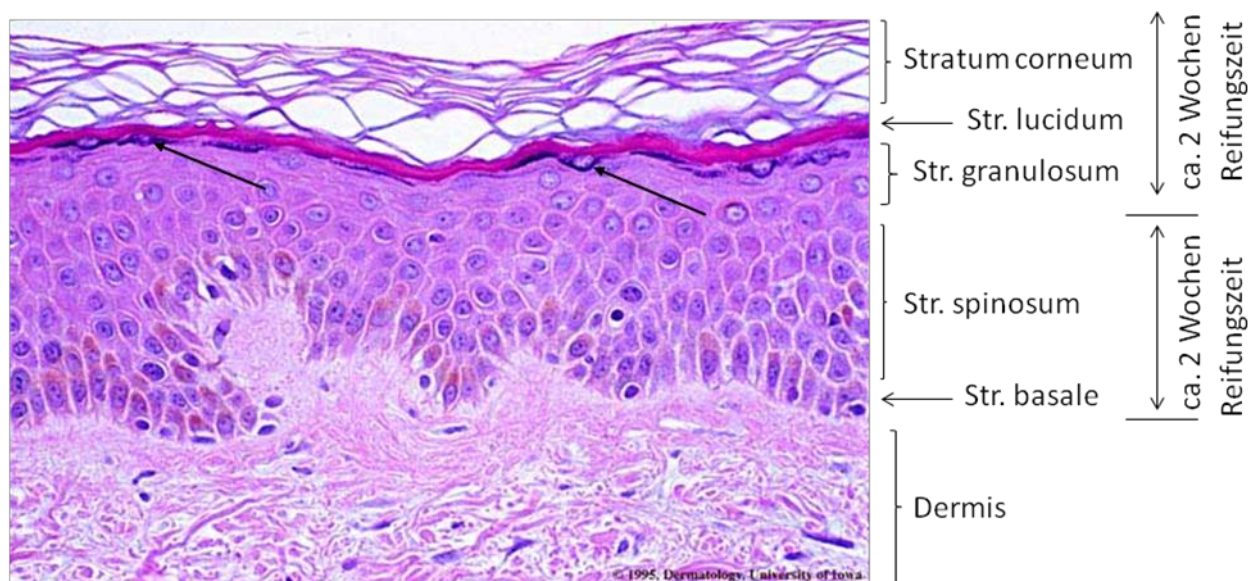
Die unterste Schicht der Epidermis, die Basalzellschicht (*Stratum basale*), enthält die gleichnamigen Zellen. Es handelt sich dabei um kubisch geformte Keratinozyten, mit einem großem Kern und vergleichsweise geringem Zytosolanteil. In dieser meist nur einzelligen Schicht liegen auch die Melanozyten, die den hauttönenden Stoff Melanin produzieren. Durch Melanin wird die Haut vor der UV-Strahlung und der damit verbundenen Schädigung geschützt.



Direkt auf der Basalschicht liegt das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht). Der Name leitet sich von dem Aussehen der Keratinozyten dieser 4- bis 8-lagigen Schicht ab, die durch Desmosomen mit einander verbunden sind, dadurch ein sternförmiges Aussehen haben und der Widerstandsfähigkeit der Haut dienen. Beide Lagen bilden zusammen das *Stratum germinativum*. In dieser, auch Keimschicht genannten Zellschicht, findet die Zellneubildung statt, um die abgetragenen Zellen an der Oberfläche wieder zu ersetzen. Es schließt sich das *Stratum granulosum* an, das aus abgeflachten Zellen besteht, die stark lichtbrechende basophile Körnchen enthalten *Keratohyalin*, in denen auch die natürlichen Feuchthaltefaktoren (*natural moisturizing factors*) gebildet werden (siehe Pfeile in Abbildung 2). Diese Körnchen sind im Mikroskop gut erkennbar und geben dieser Schicht ihren deutschen Namen als Körnerzellschicht.

An den Hand- und Fußinnenflächen kommt das *Stratum lucidum* sichtbar vor. Diese einzellige Schicht erscheint im Lichtmikroskop optisch dichter. Die Zellen sind kernlos und kaum noch von einander abgetrennt.

Die äußerste Zellschicht bildet das *Stratum corneum*. Sie besteht aus flachen, fest gepackten und kernlosen Hornzellen, den Korneozyten. Aufgrund ihrer Struktur verlängert die Hornschicht den natürlichen Diffusionsweg und ist damit für die Rückhaltung von Wasser essentiell. Der Weg eines Keratinozyten von der Basalzellschicht bis zum Abtragen an der Hautoberfläche des Stratum corneum dauert in der Regel 4-6 Wochen [115]. Die oberste Zellschicht der Epidermis, ist auch die Schutzschicht der Haut. Sie dient dazu chemische und mechanische Einwirkungen abzufangen. Außerdem gehen in dieser Schicht Zellen verloren und werden immer wieder durch neue Zellen aus den unteren Schichten ersetzt und komplettieren so den Kreislauf der Hauterneuerung. Dieser Vorgang ist auch dafür verantwortlich dass die Haut eine konstante Dicke aufweist.



**Abbildung 2:** schematische Darstellung Epidermis-Aufbau adaptiert von [127], Pfeile zeigen Keratohyalin-Körnchen

## 2.3 Infektionen der Haut und Schleimhaut (Kandidose)

Neben Bakterien und Viren gehören Pilze zu den Keimen, die erregerspezifische Entzündungsreaktionen der Haut verursachen können. *Candida albicans* (*C. albicans*) ist der häufigste Auslöser fungaler Haut- und Schleimhautinfektionen bei Menschen. *C. albicans* ist auch der vierthäufigste Erreger einer nosokomialen, systemischen Erkrankung verbunden mit einer hohen Sterblichkeitsrate [18, 58, 80, 117]. Kandidosen können sowohl lokal begrenzt, als auch systemisch auftreten, wobei die generalisierte Erkrankung ausschließlich bei Patienten beobachtet wird, deren Immunsystem in irgendeiner Weise geschwächt ist.

Lokal ist die Kandidose nicht nur auf die Haut beschränkt, sondern kann auch auf den angrenzenden Schleimhäuten auftreten. Eine Infektion der mukosalen Epithelien mit *C. albicans* wird umgangssprachlich auch als Soor bezeichnet, abgeleitet vom altdeutschen Wort „soor“, das „wund machen“ bedeutet. Eine lokal hohe Feuchtigkeit begünstigt das Wachstum der Hefe, weshalb Infektionen besonders häufig interdigital, submammär oder im Genitoanalbereich auftreten [33, 52]. Etwa  $\frac{3}{4}$  aller Frauen sind mindestens einmal in ihrem Leben vor allem von der vaginalen Kandidose betroffen, was zum Teil mit einem starken Leidensdruck einher geht [99].

Okklusion, Mazeration und jede Art von Einschränkung der Barrierefunktion der Haut, allen voran des *Stratum corneums*, begünstigen eine Infektion [52]. Die kutane

Kandidose ist gekennzeichnet durch Parakeratose, Hyperkeratose, Spongiose sowie intra- und subcorneale Mikroabzesse.

Besonders häufig betroffen sind Menschen, deren Immunsystem vorübergehend oder dauerhaft eingeschränkt ist, zum Beispiel aufgrund der Anwendung von Antibiotika, Chemotherapeutika, Glukokortikoiden oder Immunsuppressiva. Aber auch der altersbedingte Immunstatus spielt eine Rolle. So sind Säuglinge und ältere Patienten häufiger von einer Infektion betroffen.

Kontrazeptiva, Hormone und Schwangerschaften erhöhen aufgrund der Beeinflussung des pH-Haushalts in der Scheide die Wahrscheinlichkeit einer Infektion. Desweiteren spielt auch ein erhöhter Östrogenspiegel, wie er z. B. während einer Schwangerschaft auftritt, eine entscheidende Rolle. *C. albicans* exprimiert selbst Östrogenrezeptoren, die das Wachstum der Hefe nach Aktivierung weiter fördern [19].

*C. albicans* ist nicht der einzige Erreger einer Kandidose, so können auch die folgenden non-albicans Stämme für eine Infektion verantwortlich sein: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsolosis*, *C. guilhermondii* und *C. krusei* [59, 79, 86].

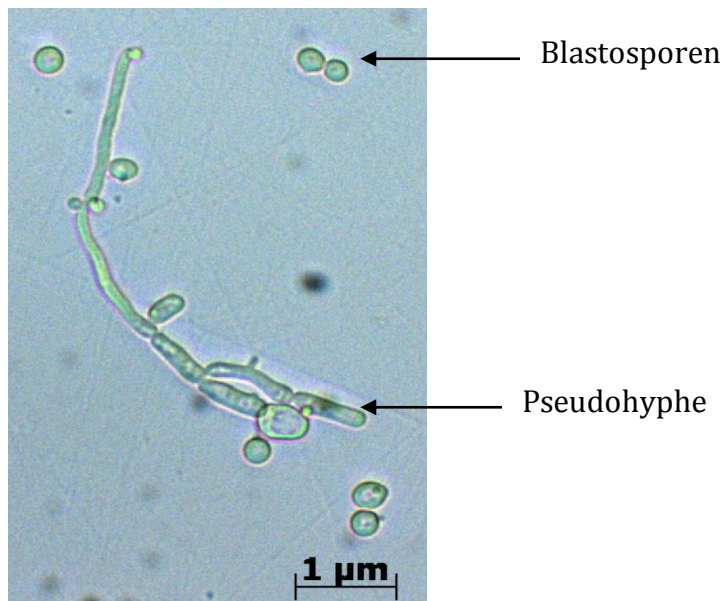
## 2.4 *Candida albicans* (*C. albicans*)

*C. albicans* aus der Klasse der *Saccharomyces* ist ein opportunistischer Keim und gleichzeitig der virulenteste Vertreter innerhalb der Gattung *Candida* [52]. Humanpathogene Keime werden mit Hilfe des DHS-Systems nach Rieth klassifiziert, wobei *C. albicans*, als ein Vertreter der humanpathogenen *Candida*-Arten, zu den Hefen gezählt wird.

Der Pilz ist in der Lage in verschiedenen Wachstumsformen zu existieren (vgl. 2.6) [54]. In der Hefe-Form, den Blastosporen, sind die Zellen rund bis oval und maximal 5 bis 7µm breit und 6-10µm lang. Sie entstehen durch Knospung und das Abtrennen von der Mutterzelle, wobei die Oberfläche an der Trennfläche dann so verändert wird, dass dort eine weitere Knospung erschwert ist.

Hyphen stellen die aktive Besiedlungsform dar und sind zum Teil bereits mit dem bloßen Auge erkennbar. Sie unterscheiden sich von den Pseudohyphen durch das Vorhandensein von Septen, treten jedoch, wenn überhaupt, nur in geringer Zahl auf. Bei *C. albicans* geht man davon aus, dass vor allem Pseudohyphen gebildet werden [16]. Pseudohyphen sind eine Ansammlung von nicht voneinander getrennten Einzelzellen, die durch Sprossung entstanden sind. Die Überdauerungsformen werden Clamydosporen genannt, sie zeichnen sich durch eine widerstandsfähige und dickere Zellwand aus, sind oftmals grö-

ßer als Blastosporen und werden von Hyphen und Pseudohyphen gleichermaßen gebildet.



**Abbildung 3:** Pseudohyphe und Blastosporen von *C. albicans*

## 2.5 Antimykotika

Antimykotika nennt man Substanzen, die zur Behandlung von Pilzinfektionen eingesetzt werden. Mit der Einführung von Griseofulvin und Flucytosin wurde in den 60iger Jahren des vorherigen Jahrhunderts diese Arzneistoffgruppe begründet. An dieser Stelle wird nur auf die beiden häufigsten Arzneistoffgruppen zur Behandlung der oberflächlichen Candidose eingegangen.

### **Azole:**

Innerhalb dieser Arzneistoffgruppe unterscheidet man zwischen Imidazol-Derivaten (z. B. Clotrimazol, Ketoconazol, Miconazol) und Triazol-Derivaten (z. B. Fluconazol, Itraconazol). Die Substitution des Imidazol-Rings durch einen Triazol-Ring erhöht die Affinität zum Zielenzym und gleichzeitig die metabolische Stabilität. Durch diese Veränderung konnte auch die Verträglichkeit und Halbwertszeit erhöht werden, während die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen verringert wurden [51, 73]. Die Imidazol-Derivate werden lokal angewandt, wobei die Triazol-Derivate vorwiegend systemisch eingesetzt werden.

Alle Azole greifen in die Ergosterol-Biosynthese ein. Ergosterol ist ein fundamentaler Bestandteil der Pilzmembran und daher von entscheidender Bedeutung für die Membranfunktion. Diese Wirkstoffklassen hemmen das Cytochrom-P450, welches für

die Funktion der Lanosterolmethylase zur Bildung von Ergosterol als Hauptbestandteil der Pilzmembran verantwortlich ist [39, 77]. Während der Zellteilung ist die Vernetzung über Ergosterol dann nicht mehr möglich, daher auch die fungistatische Wirkung, da diese von der Ergosterolsynthese und der Zellteilung abhängig ist [67, 72].

### **Polyene:**

Zu den wichtigsten Vertretern der Polyene gehören das parenteral verabreichbare Amphotericin B, sowie die ausschließlich lokal angewendete Substanz Nystatin. Diese Substanzklasse wirkt im Unterschied zu den Azolen sowohl fungistatisch, jedoch vor allem auch fungizid. Wobei die fungizide Wirkung erst bei hohen Dosen nachweisbar ist. Aufgrund der amphiphilen Struktur der Polyene kommt es zur Einlagerung und Komplexbildung mit Ergosterol-Molekülen der Pilzmembran. Dies führt zur Porenbildung und einer damit verbundenen erhöhten Membranpermeabilität, was letzten Endes das Absterben der Zelle zur Folge hat [73]. Wegen des hohen Nebenwirkungspotentials, besonders der Nephrotoxizität unterliegt die Anwendung einer strengen Indikationsstellung.

## **2.6 Virulenzfaktoren**

Die Virulenz beschreibt den Grad der Aggressivität oder „Giftigkeit“ von Mikroorganismen im Makroorganismus als quantitative Eigenschaft [1].

Als Virulenzfaktoren gelten Eigenschaften eines Mikroorganismus, die ausschließlich für eine Interaktion mit dem Wirt nötig sind und dem Keim im Idealfall einen Überlebensvorteil verschaffen, jedoch nicht für das normale Wachstum (z. B. in Kultur) benötigt werden [38].

*C. albicans* verfügt über eine Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren die folgend näher erläutert werden.

### **2.6.1 Phänotypisches Switching**

Das phänotypische *switching*, beschreibt die Fähigkeit, makroskopisch unterschiedliche Kolonien zu bilden unter anderem durch Veränderung der Oberflächeneigenschaften, wie antigene Strukturen. Die Hefeform von *C. albicans* ist befähigt die *white* oder *opaque*-Form anzunehmen, abhängig von Umwelteinflüssen die auf ihn einwirken [112]. Die *white*- Kolonien haben ein glattes, glänzendes Aussehen und bestehen vorwiegend

aus runden bis ovalen Hefezellen, die pH-abhängig auch als Hyphenform wachsen können. In Adhärenz-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass diese Morphologie sich auch in größerer Zahl an Epithelien anzulagern vermag als die *opaque*-Form.

Die *opaque*-Form hingegen beherbergt Zellen, die größer und flacher sind, sie zeigen außerdem eine größere Tendenz zur Koadhäsion [46]. Die beiden Koloniemorphologien unterscheiden sich weiter in der Zellwandstruktur, Proteinzusammensetzung, Hydrophobizität, Adhärenz sowie ihrer Empfindlichkeit gegenüber antimykotisch wirksamen Substanzen [110, 111]. Es wird vermutet, dass die *opaque*-Form, eine Kolonisierung erleichtern kann. Begründet wird dies damit, dass die abgeflachten Zellen auch eine größere Oberfläche für eine Anlagerung an Epithelien zur Verfügung haben. Außerdem sind sie unempfindlicher gegenüber Umwelteinflüssen und antimikrobiellen Substanzen. Nachweisbar ist ein erhöhter Wechsel zwischen beiden Morphologien bei Patienten mit vorliegender oraler Kandidose im Vergleich zur Kontrollgruppe mit asymptomatischen Trägern. Es wird daher vermutet, dass der Erreger sich auf diese Weise besser den physiologischen Bedingungen verschiedener Gewebe im Verlauf der Infektion anpassen kann [1].

### 2.6.2 Dimorphismus

*C. albicans* hat die Fähigkeit sowohl in ballartiger, einzelliger Hefenform als auch in mehrzelliger, filamentöser Hyphenform zu wachsen [121]. In der Hefenform liegt *C. albicans* vor allem dann vor, wenn die Wachstumstemperatur unter 35°C, der pH unter 6,5 liegen und Glucose als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen. Dies stellt die nicht invasive Form, in einer stressfreien Situation dar. (Pseudo-)Hyphen sind die aggressive Besiedlungsform [21, 48]. Ihr Wachstum wird durch Stresssituationen begünstigt und tritt bei einer Temperatur von mehr als 35°C vermehrt auf, was auch für die Körpertemperatur des Menschen zutrifft und ihn als Wirt prädestiniert. Ausgelöst werden kann die Bildung der Hyphenform durch Serumbestandteile, einen ungünstigen Kohlenstoffdioxidgehalt, Nahrungsmangel und Kontakt mit Oberflächen. Felk *et al.* konnte zeigen, dass Mutanten die die Fähigkeit zum dimorphen Wachstum aufgrund von genetischen Veränderungen verloren hatten gleichfalls auch eine geringere Virulenz zeigten und auch die Gewebsinvasion geringer war [32, 54]. Das Hyphenwachstum wird außerdem mit einer verbesserten Fähigkeit phagozytierenden Zellen zu entgehen, verbunden [2, 12]. In verschiedenen Studien konnte in infizierten Geweben beide Wachstums-

formen nebeneinander nachgewiesen werden. Es scheinen daher beide Morphologien gleichermaßen für die Pathogenese von Bedeutung zu sein [85, 123]. Aller Wahrscheinlichkeit nach kann sich jeweils eine Wachstumsform besser an die vorherrschenden Bedingungen am Infektionsort anpassen.

### 2.6.3 Adhäsion

*C. albicans* ist in der Lage an verschiedene Oberflächen und Membranen zu adhärieren, z. B. Endothel- und Epithelzellen, aber auch synthetischen Oberflächen wie PVC, Zellulose-Filtern und Plastik [43, 47, 79]. Bereits in den Achtziger Jahren des vorangegangenen Jahrhunderts war man in der Lage, filamentartige Strukturen an der Oberfläche von *C. albicans* nachzuweisen, die der Anhaftung an Oberflächen dienen, die Fimbriae [20, 29, 124]. Diese Anlagerung an Oberflächen stellt den ersten Schritt einer Infektion dar. Damit ist ein besonders stark adhärenter Keim virulenter, da die Wahrscheinlichkeit einer Infektion steigt [15, 30]. *C. albicans* weist außerdem eine erhöhte Hydrophobizität auf, die nicht nur bei der Adhäsion sondern auch bei der Resistenz gegenüber Phagozytose und Wirtsabwehr von Bedeutung zu sein scheint [62]. Es ist als humanpathogener Vertreter in der Lage, am stärksten an Epitheloberflächen zu binden und nachweislich der virulenteste Vertreter der Gattung *Candida* [29, 47, 49, 74]. Man geht daher von einem Zusammenhang zwischen erhöhter Bereitschaft sich an Oberflächen anzulagern und der Virulenz aus [29].

### 2.6.4 Thigmotropismus

Thigmotropismus oder auch „contact-sensing“ beschreibt die Fähigkeit der Hefe, aufgrund von Berührung mit der (Schleim)-Hautoberfläche die interzellulären Verbindungen aufzuspüren [36]. Dadurch ist eine gezielte Penetration in das Gewebe möglich. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Virulenzfaktor, wenn auch Pseudohyphen und Keimschläuche gebildet werden [71, 109].

### 2.6.5 Hydrolytische Enzyme

*C. albicans* bildet eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, unter anderem sekretorische Phospholipasen, sekretorische Aspartatproteinasen und Lipasen [68, 102]. Über die Rol-

le der Lipasen und Phospholipasen ist bisher sehr wenig bekannt. Es ist bis heute auch nicht gelungen Lipasen am Infektionsort der Kandidose nachzuweisen [106]. Die sekretorischen Aspartatproteinasen bilden die am besten untersuchte Gruppe. Nachweislich werden bei einem *switching* von der Hefe- in die Hyphenform Enzyme sekretiert, die aller Wahrscheinlichkeit nach für den Erhalt der Zellwandintegrität erforderlich sind und andererseits auch als wirkungsvolles Mittel zur Umgehung der Wirtsantwort zum Einsatz kommen [34]. Außerdem scheinen sie gleichfalls einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion und das Vordringen des Pathogens in tiefere Gewebeschichten zu haben [15, 69].



## 2.7 Sekretorische Aspartatproteinasen (Sap)

Die sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap) wurden erstmals 1965 beschrieben, bzw. deren proteolytische Eigenschaften [113]. Der Nachweis von Aspartatproteinasen außerhalb der Zelle in infizierten Geweben und Blut gelang einige Jahre später unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper [60, 82, 92]. Sap sind in der Lage, Kollagen, Keratin und Muzin zu hydrolysieren, was sie maßgeblich von anderen humanen Aspartatproteinasen wie Pepsin und Renin unterscheidet, die diese Fähigkeit nicht besitzen und um den Faktor zehn schwächer hydrolytisch wirken [23]. Inzwischen ist bekannt, dass es sich nicht um ein einziges Enzym handelt, sondern um eine Enzymklasse, mit bisher zehn bekannten Isoenzymen. Den Isoenzymen kommen dabei vermutlich unterschiedliche Aufgaben zu, was auch durch die verschiedenen Infektionsstadien während dessen sie sezerniert werden, deutlich wird [11, 32, 54, 92, 93, 99]. Die Sekretion der Proteinasen findet unmittelbar nach der Translation statt. Dabei wird das fertige Protein vom endoplasmatischen Reticulum über den Golgi Apparat in Vesikel eingeschlossen, die ihren Inhalt durch Verschmelzen mit der Plasmamembran nach außen in den Extrazellularraum abgeben [40, 42].

Sap unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz und Molekulargewicht (zwischen 35-48 kDa), sondern gleichfalls in ihren enzymatischen Eigenschaften (z. B. pH-Optimum) [9, 23]. Es wird vermutet, dass sie die Adhäsion an Epithelien verstärken und somit die Invasivität von *C. albicans* in einen Wirtsorganismus erhöhen [23, 40, 90]. Dafür spricht auch, dass die enzymatische Aktivität mit dem Grad der Virulenz im Tiermodell korreliert [81, 120]. Sap können durch Pepstatin A und dessen synthetische Derivate kompetitiv gehemmt werden, ebenso wie auch durch HIV-Proteaseinhibitoren. Die HIV-Protease gehört zur gleichen Gruppe wie die hier besprochenen Aspartat Proteinasen, doch sind diese komplexer aufgebaut, größer und weisen ein höheres Molekulargewicht auf als die HIV-Protease [42].

### 2.7.1 Bedeutung der Sap als Virulenzfaktor

Durch die Einführung von Protease-Inhibitoren zur Behandlung von HIV-Patienten in den neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts war ein deutlicher Rückgang im Vorkommen und der Intensität oraler Kandidosen bei dem behandelten Patientenkontingent zu verzeichnen [41, 66]. Zuvor erkrankten 36-88% aller HIV-Patienten bis vor dem

Einsatz des HAART-Therapiekonzeptes (hoch aktive antiretrovirale Therapie) mindestens einmal im Verlauf Ihrer Infektion an einer oralen Kandidose [75]. Zingman führte dies auf den verbesserten Allgemeinzustand zurück [125]. Jedoch konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass Saquinavir und Indinavir in der Lage waren, nicht nur die HIV-Protease zu hemmen, sondern gleichfalls auch die fungalen Aspartatproteinasen [17, 37, 53].

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der fungalen Proteinase in HIV-infizierten Patienten höher lag als in nicht infizierten Patienten [75]. Aus diesem Grund wurde auf eine erhöhte Virulenz von *C. albicans* bei HIV-Patienten geschlossen. Ferner konnte gezeigt werden, dass genetisch veränderte *Candida*-Stämme im Hautkonstrukt-Modell der oralen Kandidose, die verschiedenen Sap-Isoenzyme (SAP 1-3) nicht mehr produzieren konnten, weniger Gewebeschäden verursachten als der unveränderte Wildtyp [44, 90, 99]. Weiterhin zeigten Mutanten, die nicht in der Lage waren SAP 4-6 zu produzieren eine geringere Anzahl an Gewebe-infiltrierten Hefezellen, womit diese Isoenzyme vornehmlich für die systemische Infektion von Bedeutung zu sein scheinen. Dies konnte auch in verschiedenen Tiermodellen bestätigt werden [32, 60, 61, 87, 96].

Auch die Wirtsantwort scheint die Virulenz von *C. albicans* durch die Sekretion von Sap zu beeinflussen, da diese Enzyme auch in der Lage sind Antikörper und Zytokine abzubauen. Hefezellen können außerdem der induzierten Phagozytose als Wirtsantwort durch die Ausschüttung von Sap besser standhalten [23]. Die Hemmung der Sap durch den Inhibitor Pepstatin führt daher nachweislich zu einer verringerten Adhärenz von *C. albicans* an verschiedene Gewebe und zeigt gleichfalls eine geringere Virulenz [13, 74, 119], die auch im Tiermodell nachgewiesen werden konnte [81].

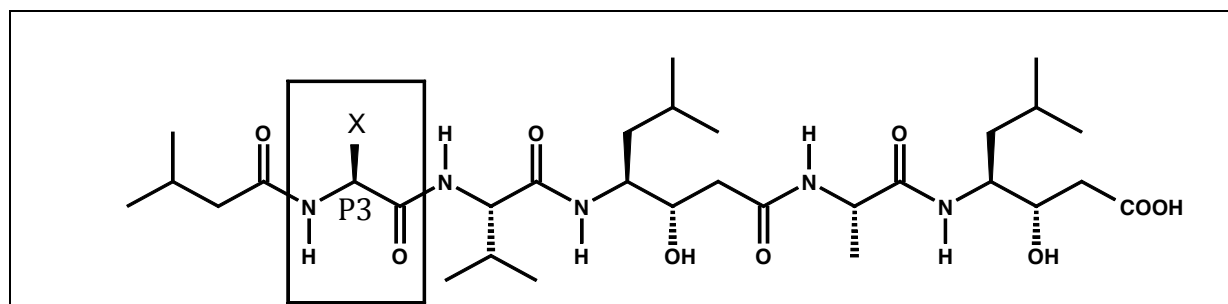
### **2.7.2 Pepstatin und Pepstatin-Analoga als Inhibitoren sekretorischer Aspartatproteinasen**

Pepstatin A gehört zur Gruppe der Peptide und wird von *Actinomyces*-Arten produziert, wo sie einen natürlichen Schutz vor anderen Keimen darstellen [116]. Es handelt sich um ein aus fünf Aminosäuren aufgebautes Oligo-Peptid, das unter anderem sekretorische Aspartatproteinasen kompetitiv und unselektiv zu hemmen vermag. In der Forschung wird Pepstatin A schon seit Jahren als Goldstandard eingesetzt um die Sap-Hemmung zu initiieren. In der Therapie kann es jedoch aufgrund ungünstiger Pharmakokinetik nicht eingesetzt werden, da es bereits bei der ersten Leberpassage

nahezu vollständig aus dem Blutkreislauf entfernt wird und nicht am Wirkort zur Verfügung stehen kann [81].

Die verwendeten Inhibitoren die Gegenstand dieser Arbeit sind, leiten sich chemisch von Pepstatin A ab [10, 11, 14]. Diese Inhibitoren wurden nach Aufklärung der Target-Struktur, welche die Sap darstellen, durch *Molecular Modeling* als mögliche Wirkstoff-Kandidaten identifiziert [10, 84]. Man erhofft sich dadurch Substanzen zu finden, die zum einen stärker wirksam sind als Pepstatin A. Außerdem sollte auf diesem Wege auch das Problem der schnellen Metabolisierung und Elimination aus dem Körper entgegengewirkt werden.

Es existieren drei unterschiedliche Inhibitor-*libraries*. Eine dieser *libraries* beinhaltet Modifikationen in der P3-Position des Moleküls. Die beiden getesteten Sap-Inhibitoren unterscheiden sie sich in eben dieser Position von dem ursprünglichen Molekül Pepstatin A, durch einen eingefügten p-Methyl-Phenolring (Inhibitor R) bzw. m-Fluor-Phenolring (Inhibitor M) (s. Abbildung 4, Kasten im Molekül zeigt P3-Position).



X = —CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Pepstatin
—CH <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Me)Ph	Inhibitor R
—CH <sub>2</sub> ( <i>o</i> -F)Ph	Inhibitor M

**Abbildung 4:** Struktur von Pepstatin und verwendeten Pepstatin-Analoga, X bezeichnet die unterschiedlichen Reste des Moleküls je nach Substanz

## 2.8 Ziel dieser Arbeit

Die Anzahl und Intensität von oralen Kandidosen bei HIV-Patienten konnte durch den Einsatz der HAART-Therapie nachweislich gesenkt werden. Dies wird mit der Hemmung der sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap) in Verbindung gebracht, die strukturell mit den HIV-Proteasen verwandt sind und durch die in der HIV-Therapie eingesetzten Wirkstoffe gehemmt werden können [41, 66]. Der Einsatz von Sap-Inhibitoren erscheint daher vielversprechend, um bereits vorhandene Resistenzen gängiger Antimykotika auszugleichen [6, 35, 83].

Ein Einsatz von Sap-Inhibitoren wäre nicht nur in der Therapie der lokalisierten Kandidose, sondern möglicherweise auch in der Behandlung der systemischen Candida-Infektion denkbar.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung der sekretorischen Aspartatproteinasen mit einer geminderten Virulenz von *C. albicans* einhergehen [23, 40, 54, 87, 93, 95, 99]. Begründet wird diese Beobachtung unter anderem mit der Abnahme der Adhärenz an Epithelien und damit verbundenen Behinderung der Hyphenbildung [32, 49, 74].

Beide Vorgänge sind für den Prozess der Infektion unabdingbar, da das Eindringen der Hefen nur geschehen kann, wenn diese sich an die epithelialen Oberflächen anlagern können [63]. Aus diesem Grund erscheint der Einsatz des Candida-Keratinocyten-Adhärenz-Assay sinnvoll um die verminderte Adhärenz unter Pepstatin A, als ersten Schritt in der Pathogenese zu untersuchen.

Diese ist für Pepstatin A bereits bekannt und wird für die chemischen Analoga überprüft [10, 74].

Die weitere Analyse des therapeutischen Potentials erfolgt in Hautkonstrukt gestützten Modellen. Dabei wird die Wirkung der eingesetzten Substanzen auf das Schleimhautmodell *in-situ* auf den Verlauf der Kandidose untersucht werden. Diese Charakterisierung wird sowohl histologisch als auch immunologisch mittels Lakatat-Dehydrogenase-Bestimmung vorgenommen.

In der Literatur wurden bisher keine direkte Messung der abgegebenen Proteine im Medium mittels der *cytometric bead array* (CBA) beschrieben, sondern zumeist eine Bestimmung der Genexpression mit Hilfe von *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Die Fragestellung: ob die gefundene Genexpression, in der Literatur, mit der tat-

sächlich abgegebenen Menge an Zytokinen im Medium in Zusammenhang steht, wird auch als Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit überprüft.

Die Daten der quantitativen Bestimmung der Zytokine: Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin-1alpha (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-8 (IL-8) mittels *CBA* erfolgen in einem weiteren Schritt. Diese Bestimmungen dienen zur Untersuchung des Zustandes des Hautkonstrukts nach der Infektion mit den Hefezellen und sind auch ein Hinweis auf die Wirtsantwort des infizierten Gewebes.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Candida-Keratinozyten-Adhärenz-Assay

#### 3.1.1 Prinzip

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von Sap-Inhibitoren zu einer verringerten Anzahl adhärenter Hefezellen an Epithelzellen führt [74]. Aus diesem Grund wurde die Adhärenz von *Candida*-Zellen an primären, neonatalen Keratinozyten untersucht und dient als Indiz für die Virulenz der Hefen. Im Anschluss an die Inkubation einer bestimmten Anzahl Hefezellen mit einer Sap-Inhibitor- bzw. Kontrolllösung und Epithelzellen, wurden die noch adhärennten *Candida*-Zellen an den Keratinozyten fixiert, fotografiert und ausgezählt. Es wird davon ausgegangen, dass eine geringere Adhärenz auch mit einer verminderten Virulenz und somit mit vermindertem Schaden einhergeht.

#### 3.1.2 Primäre Keratinozyten

Bei den verwendeten Keratinozyten handelt es sich um Zellen neonataler Vorhaut, die während eines Routineeingriffs entnommen wurden.

Für die Kultivierung wurden zunächst 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen/Deutschland) mit Coating Matrix Kit (Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland) nach Herstellerangaben 30 Minuten bei Raumtemperatur imprägniert, um ein Anhaften der Epithelzellen gewährleisten zu können. Dafür wurden 5 mL *Dilution Medium* und 50 µL *Coating Matrix 10x concentrate* in der Flasche gemischt. Anschließend wurden primäre humane neonatale Keratinozyten (Invitrogen) laut Herstellerangaben aufgetaut und so verdünnt, dass  $1,25 \times 10^4$  Zellen/mL pro in die vorbereiteten Gewebekulturflaschen gegeben wurden, um eine Dichte von  $2,5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> zu erhalten.

Anschließend wurden die Gewebekulturflaschen bei 36°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert bis die Zellen zu ca. 80% konfluent waren. Mediumwechsel erfolgten alle 2-3 Tage mit *Epilife Medium* (Invitrogen), das zusätzlich noch *Epilife defined growth Supplement* (EDGS) (Invitrogen) und Gentamicin 10 µg/mL (DeltaSelect GmbH, Dreieich/Deutschland) enthielt.

Die Zellen wurden mit 2 mL 0,025% Trypsin-EDTA (Invitrogen) von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst, zuvor wurden die Gewebeflaschen zweimal mit je 5 mL Phosphat-

gepufferter Natriumchlorid-Lösung (PBS) (Invitrogen) gewaschen. Um die Enzymreaktion zu stoppen wurden 2 mL definierter Trypsin Inhibitor (Invitrogen) hinzugegeben. Die gelösten Zellen wurden abgesaugt und mit Hilfe einer Zentrifuge (Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz/Deutschland) bei 900 rpm, 22°C, 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 4 mL *Epilife Medium* resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer-Kammer wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter ermittelt und die Suspension auf  $5 \times 10^5$  Zellen/mL eingestellt. Je 100  $\mu$ L dieser Suspension wurden dann in ein Well einer 96-Well-Platte eingegeben, die zuvor nach dem gleichen Prinzip mit der *Coating Matrix* imprägniert wurde. Die Epithelzellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heracell 240i, Thermo Fisher, Lagenselbold, Deutschland) bis zur Konfluenz kultiviert (Monolayer).

### 3.1.3 *C. albicans* (Wildtypstamm SC5314)

Kryoröhrchen (Simport, Beloeil, Quebec/Kanada) mit *Candida*-Stamm SC5314 wurden aus -20°C Kühlung entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. 50  $\mu$ L der Suspension wurden auf Kimmig-Agar gegeben, mit Hilfe einer ausgeglühten Platinöse verteilt und anschließend bei 28°C, 48 Stunden im Brutschrank kultiviert.

0,6 mL des YNB (*yeast nitrogene base*) (Difco Laboratories GmbH, Augsburg/ Deutschland) 10-fach Konzentrats wurden mit 5,4 mL destilliertem Wasser gemischt, mit Hilfe einer abgeflamten Platinöse wurde eine Einzelkultur *C. albicans* von der Agarplatte entnommen und in die Bouillon eingegeben. Anschließend wurde bei 28°C, 150 rpm über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert.

Die Synchronisation der Hefezellen erfolgte mit dem Ziel, eine einheitliche Morphologie sicher zu stellen und die Hyphenbildung möglichst zu vermeiden.

Am nächsten Tag wurde die Suspension erst gründlich gemischt (Vortex), dann zentrifugiert (900 rpm, 10 min, 22°C), anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen, dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt und die Zellen anschließend in 5 mL PBS resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer Kammer wurde die Anzahl der Hefezellen pro Milliliter bestimmt und schließlich die Suspension mit Hilfe von PBS auf  $10^6$  Zellen/mL eingestellt.

### 3.1.4 Inhibitorlösungen

5 mg Pepstatin A wurden in 0,7289 mL 75%igem Methanol (V/V) gelöst und bei 60°C für 10 Minuten erhitzt bis sie vollständig gelöst waren. Die so angefertigte Stammlösung enthielt 10 mol/l Pepstatin A. Zwei Verdünnungen 1:10 und 1:100 wurden von der Stammlösung ausgehend hergestellt, dafür wurden für die 1:10-Verdünnung 300 µL Stammlösung mit 2700 µL PBS gemischt und für die 1:100 Verdünnung 42 µL 1:10-Verdünnung mit 378 µL PBS versetzt. Die eingesetzten Konzentrationen von 1 mol/l, 0,5 mol/l, 0,2 mol/l, 0,1 mol/l, 0,01 mol/l und 0,001 mol/l pro Well wurden zunächst als doppelt konzentrierte Lösungen hergestellt (s. Tabelle 1):

Endkonzentration in mol/l	Volumen und Art Pepstatin Lösung	Volumen PBS
2	360µL Stammlösung	1400µL
1	1800µL 1:10-Verdünnung	-
0,4	720µL 1:10-Verdünnung	1080µL
0,2	360µL 1:10-Verdünnung	1440µL
0,02	360µL 1:100-Verdünnung	1440µL
0,002	36µL 1:100-Verdünnung	1764µL

**Tabelle 1:** Volumenangaben zur Herstellung der Inhibitorlösungen

Dazu wurden die Lösungen wie oben beschrieben in einem Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg/ Deutschland) zusammengegeben und gemischt. Je 200 µL der entstandenen Lösungen wurden in Eppendorfgefäße gegeben und bei -20°C aufbewahrt. Für einen anstehenden Versuch wurden diese Lösungen wieder aufgetaut und mit je 200 µL eingestellter *Candida*-Suspension versetzt, anschließend 30 Minuten auf Eis bei 0°C inkubiert. Die Zugabe von Hefezellen stellt einen weiteren Verdünnungsschritt dar. Die endgültige Inhibitor-Konzentration betrug dann 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,01 und 0,001 mol/l.

Die Testlösungen des Inhibitors R wurden in gleicher Weise und in denselben Verdünnungen der entsprechenden Lösungen hergestellt. Für die 10 mol/l Stammlösung des Inhibitors R wurden dafür (entsprechend der Molaren Masse von 747,5 g/ mol)

747,5 µL 75%-iger Methanol verwendet.

Die Auswahl der hier getesteten Inhibitoren (Inhibitor R und M) erfolgte durch einen in unserer Arbeitsgruppe bereits vorangegangenen Fluoreszenz-Inhibitorentest [10, 100]. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte das Sap-inhibierende Potential abge-



schätzt werden [10]. Inhibitor R ist demnach auch in geringen Konzentrationen in der Lage, die sekretorischen Aspartatproteinasen zu hemmen und weist gleichzeitig eine vergleichbare Löslichkeit auf wie Pepstatin A.

Einzig für Fluconazol wurde ein anderes Verdünnungsverfahren gewählt, da die minimale Hemmkonzentration erfahrungsgemäß bei 64 ng/mL liegt und damit wesentlich stärker verdünnt werden muss.

Mit Hilfe einer Feinwaage (Kern & Sohn GmbH, Baldingen/Deutschland) wurden 50 mg Fluconazol abgewogen und in 1 mL reinem Methanol gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 10 µL mit 990 µL PBS gemischt. Im nächsten Verdünnungsschritt wurden von dieser Lösung 3 µL in 2997 µL PBS pipettiert und gemischt. Die Endkonzentration der letzten Lösung (Stammlösung) betrug damit 500 ng/mL.

Durch 1:1-Verdünnung mit PBS wurden nun die Verdünnungen wie folgt hergestellt. 2 mL der Lösung mit 500 ng/mL wurden dafür mit 2 mL PBS gemischt. Die so erhaltenen Lösungen führen somit zu den Endkonzentration von  $4 \text{ mol/l} \times 10^{-4}$ ,  $2 \text{ mol/l} \times 10^{-4}$ ,  $1 \text{ mol/l} \times 10^{-4}$ ,  $0,5 \text{ mol/l} \times 10^{-4}$ ,  $0,25 \text{ mol/l} \times 10^{-4}$  und  $0,127 \text{ mol/l} \times 10^{-4}$ .

### 3.1.5 Candida-Keratinocyten-Adhärenz-Assay

Das Medium wurde aus den Vertiefungen der 96-Well-Platte entfernt und die Zellen zwei Mal mit je 100 µL warmen PBS (ca. 36°C) gewaschen. 100 µL Testlösung wurden in jedes Well eingegeben, je 3 Wells enthielten die jeweils gleiche InhibitorKonzentration (*Candida* pro Well  $5 \times 10^4$ ). Anschließend wurde die Platte eine Stunde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit ohne Schütteln im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Testlösungen wieder entfernt und die Wells jeweils drei Mal mit 100 µL kaltem PBS gewaschen, um nicht adhärenente Hefezellen zu entfernen.

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit je 100 µL einer 3,7% Formalin-Lösung. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Platten im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Invertmikroskops bei 200-facher Vergrößerung. Je drei verschiedene Bereiche wurden fotografiert und im Anschluss die Bilder manuell ausgezählt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen (u. a. PBS, Wildtyp, Pepstatin und -Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen) wurden mit Hilfe von GraphPad Prism Version 4.03 errechnet und mit Hilfe des Student t Tests auf ihre Signifikanz hin geprüft. Werte die aus dem Bereich  $\pm 2$ -fachen der Standardab-

weichung heraus fielen, wurden als statistische Ausreißer (mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%) von der Berechnung ausgeschlossen.

## 3.2 Hautkonstrukt gestütztes Experiment

### 3.2.1 Hautkonstrukt und Medium

Bei den verwendeten Hautmodellen der Firma MatTek (Ashland, Massachusetts/USA) handelt es sich um orale Schleimhautmodelle aus humanen oralen Keratinozyten. Die Zellen werden aus Einzelspenden isoliert und in serumfreiem Medium auf beschichteten *Milipore Millicell™* Filter aus Teflon in sogenannten *Plastikinserts* gezüchtet. Die in unserem Versuch verwendeten Zellen wurden drei Tage vor Versand ausschließlich in Antibiotika- und Antimykotika-freiem Medium kultiviert und auch während der gesamten Versuchsdauer ausschließlich mit dem serumfreien MatTek-Medium ohne diese Arzneistoffe inkubiert. Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um serumfreies *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit epidermalen Wachstumsfaktoren und Phenolrot.

Vor dem Versand der Hautkonstrukte führt MatTek eine Vielzahl an Tests durch um die Qualität und die Abwesenheit von Krankheitserregern, wie Viren (HIV, Hepatitis B und C), Bakterien (unter anderem Mykoplasmen) und Pilzen zu gewährleisten.

### 3.2.2 Sap-Inhibitorlösungen

Die Herstellung der Stammlösung erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben. Die eingesetzten Lösungen in den jeweiligen Versuchen unterschieden sich dabei nicht in ihrer Konzentration, jedoch in der eingesetzten Menge.

Endkonzentration in mol/l	Volumen und Art Pepstatin Lösung	Volumen PBS
0,5	50 µL Stammlösung	150 µL
0,375	37,5 µL Stammlösung	162,5 µL
0,25	25 µL Stammlösung	175 µL
0,025	25 µL 1:10- Verdünnung	175 µL
0,0025	25 µL 1:100-Verdünnung	175 µL

**Tabelle 2:** Volumenangaben zur Herstellung der Inhibitorlösungen für Hautkonstrukt-Experimente

Je 25 µL der einzelnen Lösungen wurden in Eppendorf Gefäße gegeben und bei -20° bis zum Versuch aufbewahrt.

Für Fluconazol wurde die Stammlösung ebenfalls wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben gemischt. Anschließend wurde mit Hilfe von 1:1-Verdünnungen eine Verdünnungsreihe hergestellt, dafür wurden 300 µL PBS in fünf Eppendorfgefäße gegeben und mit 300 µL der Stammlösung bzw. der jeweils vorangehenden Lösung gemischt. Es entstehen Endkonzentrationen von 2,04; 1,02; 0,51; 0,25 und 0,127 mol/l  $\times 10^{-4}$ .

Wie bereits bei den -Inhibitorlösungen wurden auch von den Fluconazol-Lösungen aliquotiert à 25 µL und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3 Präparation und Synchronisation von *C. albicans*

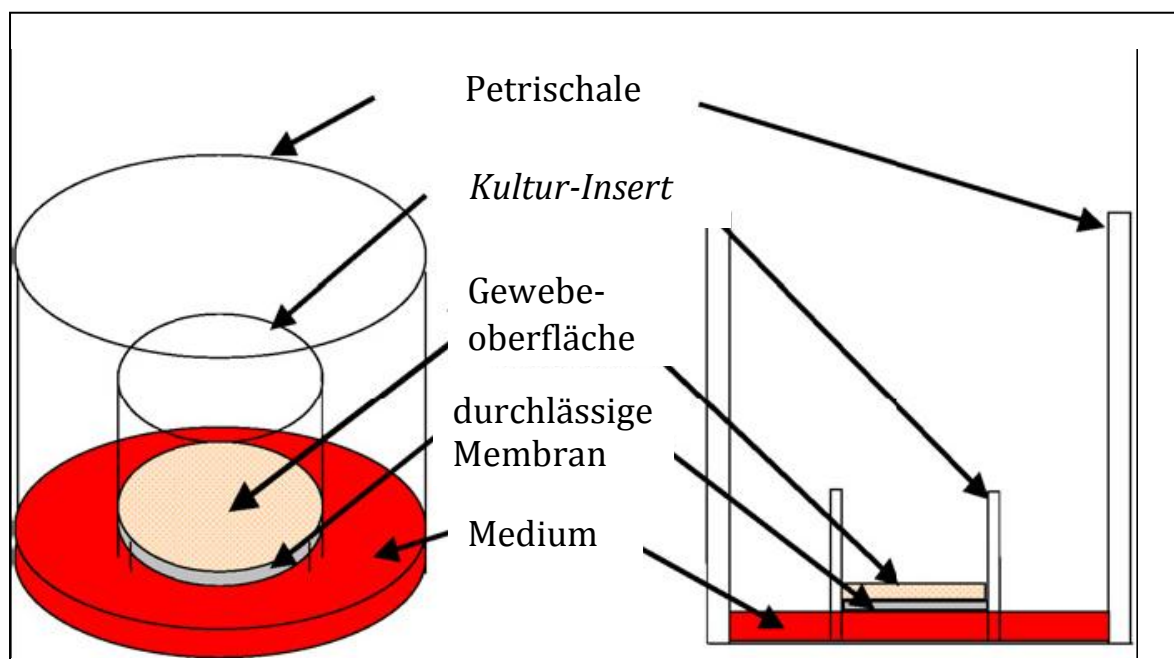
Die Vorbereitung von *C. albicans* erfolgten bereits vier Tage vor dem eigentlichen Experiment. Dafür wurde ein Kryoröhrchen mit *Candida*-Zellen des Stamms SC 5317 aus der -20°C-Kühlung entnommen und aufgetaut. Auf Kimmig-Agar wurden 50 µL der Zellsuspension verbraucht und bei 28°C im Brutschrank (ThermoFischer) für 48 Stunden kultiviert.

Im Anschluss daran erfolgte eine Synchronisation der Hefezellen, um eine einheitliche Morphologie sicher zu stellen. Dafür wurden mit Hilfe einer ausgeglühten Platinöse eine „dicke“ Öse entnommen und in 10 mL PBS (Difeco) überimpft. Mit Hilfe der Neubauer Kammer wurde die Zellzahl bestimmt,  $2 \times 10^5$  Zellen/mL werden anschließend in 10 mL *Yeast Extract Peptone Dextrose* (Hefeextrakte-Pepton-Dextrose) YPD-Medium eingimpft. Für 16 Stunden wurde die Kultur im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific) bei 150 rpm und 37°C kultiviert.

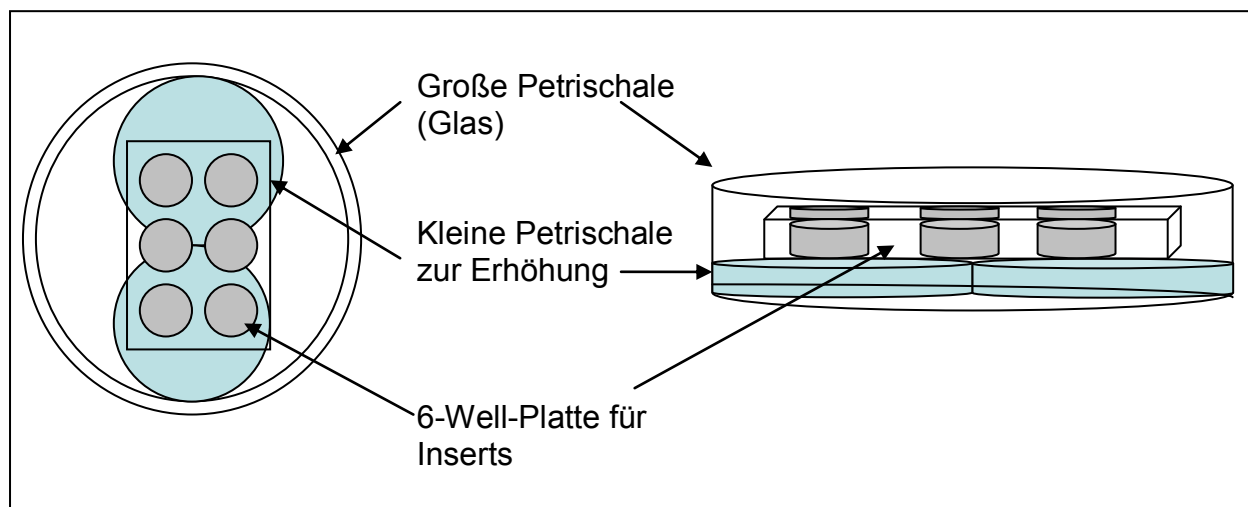
Am darauffolgenden Tag wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Hefezellen wurden dreimal mit je 5 mL PBS gewaschen, mit Hilfe der Neubauer Kammer das Pilz-Inokulum bestimmt und auf  $4 \times 10^6$  Zellen/mL in 10 mL frisches YPD-Medium gegeben und wiederum 24 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am dritten Tag wurde der Pilz erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellzahl auf  $4 \times 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Im Anschluss an die Prozedur wurde die Hefekultur erneut bei 37°C für weitere 24 Stunden inkubiert. Am Tag des Experiments wurde nochmals dreimal mit PBS gewaschen und in 5 mL PBS resuspendiert, anschließend wurde ein Inokulum von  $5 \times 10^7$  Zellen/mL eingestellt.

### 3.2.4 Durchführung des Hautkonstrukt Experiments

Vor Versuchsbeginn wurden die *Inserts* aus dem Agarose-Transport-Medium entnommen, eventuell anhaftende Gelreste entfernt und in je eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben, die bereits 900  $\mu$ L Medium enthalten. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unterhalb der Hautkonstrukte befanden (s. Abbildung 5). Die Platte wurde auf zwei umgestülpte Petrischalen in einer großen Glaspetrischale gestellt und die Glaspetrischale ca. 1/3 mit PBS Puffer befüllt. Anschließend wurde im Brutschrank über Nacht bei 36°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert (s. Abbildung 6).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Schleimhautkonstrukts der Firma MatTek [50]



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die Versuchslösungen wurden aufgetaut und mit je 75 µL eingestellter *Candida*-Suspension gemischt. Die entstandenen Flüssigkeiten wurden für eine Stunde bei 28°C, 150 rpm im Schüttelinkubator vorinkubiert. Im Anschluss daran wurden die Suspensionen vorsichtig auf- und ab pipettiert um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen. Anschließend wurden je 40 µL der Testflüssigkeit auf die apikale Seite der *Inserts* aufgetragen ( $2 \times 10^5$  *Candida*-Inokulum pro *Insert*).

Es erfolgte weiterhin ein Mediumwechsel mit je 900 µL, dessen Inhibitorkonzentration mit der Konzentration der Testsubstanz in der Testlösung korrespondierte. Anschließend wurden die Hautkonstrukte abermals für 24 Stunden bei 36°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurde eine Gruppe der Hautkonstrukte mit Hilfe eines Skalpells aus den Plastikgestellen herausgeschnitten und halbiert. Eine Hälfte wurde sofort in Karnovsky Fixierung eingegeben, um Semi-Dünnschnitte anzufertigen und so eine histologische Auswertung zu ermöglichen. Der andere Teil wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und für zukünftige Experimente bei -80°C aufbewahrt.

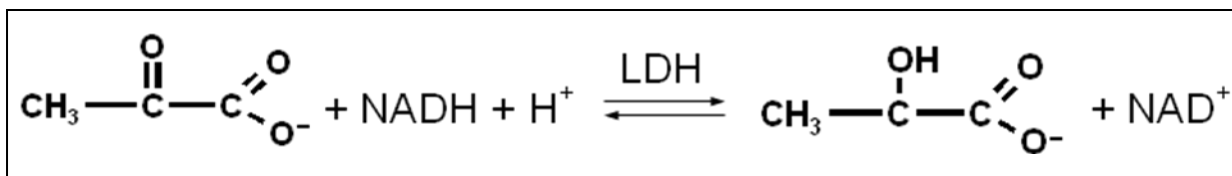
Das Medium von allen Hautkonstrukten wurde für die LDH- und Zytokin-Bestimmung entnommen.

Eine zweite Gruppe Hautmodelle, die nicht zur weiteren Diagnostik benötigt wurde, wurde abermals mit je 900 µL korrespondierendem Medium für weitere 24 Stunden bei den genannten Konditionen inkubiert (insgesamt 48 Stunden).

Anschließend wurden auch sie mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten, geteilt und anschließend entweder in Karnovsky Fixierung gegeben bzw. schockgefroren. Die Medien wurden für weitere Experimente wie die LDH-Bestimmung und die Zytokin-Bestimmung entnommen.

### **3.2.5 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Bestimmung**

Die Laktat-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat, während gleichzeitig NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert wird (s. Abbildung 7). Sie kommt in vielen Geweben in menschlichen Körper vor, unter anderem in Herz-, Lungen- und Muskelzellen. Werden diese Gewebe geschädigt zum Beispiel während eines Herzinfarktes, steigt die Serumkonzentration des im Zytoplasma vorkommenden LDH im Blutkreislauf an.



**Abbildung 7:** Umwandlung von Laktat zu Pyruvat mit Hilfe von Co-Enzym NAD<sup>+</sup>

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe der Methode der *International Federation of Clinical Chemistry*, IFCC-Methode (LDH, IFCC flüssig Kit, Roche Diagnostics, Mannheim/Deutschland) durch einen Hitachi 904 Analyseautomaten (Roche Diagnostics, Mannheim/Deutschland) im hauseigenen Routinelabor bestimmt. Die Menge gebildetem NADH ist dabei proportional zur LDH-Aktivität und kann somit indirekt mit Hilfe der Extinktionszunahme bei 340 nm spektrometrisch bestimmt werden. NAD<sup>+</sup> als oxidierte Form zeigt dieses Absorptionsmaximum im Bereich von 300 bis 400 nm nicht und stört somit nicht die Messung [3, 107].

### 3.2.6 Fixierung und Einbettung

Die Hautkonstrukte für die histologischen Untersuchungen wurden in Karnovsky Fixierung bei 4°C für 4 Stunden vorfixiert. Anschließend wurden die Gewebe dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen, und nach 15 Minuten wieder entnommen, der Puffer verworfen und durch frischen Puffer ersetzt. Die Nachfixierung erfolgte mit der Methode nach Dalton mit 1%-iger Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer für 60 Minuten. Die Epithelien wurden im Anschluss abermals zweimal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen.

Um dem Gewebe Wasser zu entziehen und es auf diese Weise zu konservieren, wurden die Proben für jeweils 15 Minuten mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (30, 50, 70, 90, 100%) behandelt wobei zweimal mit wasserfreiem Ethanol entwässert wurde. Anschließend wurden die Epithelien je zweimal in Propylenoxid gelegt.

Die Einbettung erfolgte mit Hilfe der Glycerid-Ether-Einbettung nach Luft und wurde in folgender Weise durchgeführt:

Zunächst wurde eine Kunstharzlösung aus zwei verschiedenen Komponenten hergestellt. Eine dieser Komponenten bildete eine Mischung aus 100 mL Glycidether (Serva) und 89 mL Methylnadicanhydrid (Serva), während die zweite aus 62 mL Glycidether und 100 mL Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (Serva) bestand. Beide Komponenten wurden im Verhältnis 3:2 gemischt und mit 1,5% p-Dimethylaminomethylphenol

(Serva) als Polymerisationsbeschleuniger versetzt. Die Proben wurden wie in Tabelle 3 zu erkennen in Mischungen aus Kunstharz und reinem Ethanol für eine vorgegebene Zeit eingebettet.

Verhältnis (Kunstharz : Ethanol)	Dauer
1:1	1 Stunde
2:1	2 Stunden
Reines Kunstharz	3 Stunden

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Kunstharzes und Einbettungsdauer

Anschließend wurde die Kunstharzmischung erneuert und die Epithelien über Nacht bei 4°C gekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Kunstharz-Mischungen auf 37°C erwärmt, mit dem Ziel den Restalkohol zu entfernen. Die einzelnen Hautproben wurden aus der Kunstharzlösung genommen, unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Rasierklinge zerteilt und in Einbettungsformen mit flüssiger Kunstharzlösung eingebettet. Zur Aushärtung wurden die Formen 7 Tage bei 60°C im Brutschrank aufbewahrt.

### 3.2.7 Präparation und Durchführung der lichtmikroskopischen Methode

Nach dem Aushärten wurden die Kunstharzblöcke aus den Einbettformen entnommen und getrimmt (Ultracut, Reichert). Im Anschluss daran wurden Semidünnschnitte unter Zuhilfenahme eines Ultramikrotoms (Reichert) von etwa 1 µm Dicke hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Die gefertigten Schnitte wurden mit Färbelösung bestehend aus einem Teil 1% Pyronin G-Lösung und 1% Toluidinblau (Apotheke des Innenstadtklinikums LMU) sowie vier Teilen 1%iger Dinatriumtetraboratpuffer (Apotheke des Innenstadtklinikums LMU) behandelt, 5 Minuten bei 60°C auf der Heizplatte gefärbt und anschließend getrocknet.

Die getrockneten Objektträger wurden in Xylol (Serva) eingetaucht, nach 5 Minuten entnommen, getrocknet und mit Eukitt (O. Kindler GmbH) sowie einem großen Deckglas (24 x 40 mm, Menzel-Gläser) abgedeckt um die Schnitte zu fixieren und zu versiegeln.

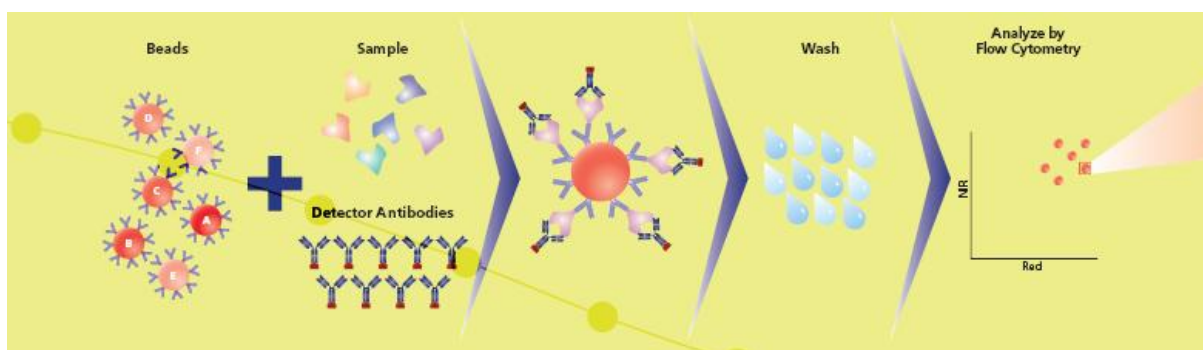
Im Anschluss daran wurden die Schnitte unter einem Mikroskop in 400-facher Vergrößerung unter histologischen Gesichtspunkten, wie Eindringtiefe der Hefezellen, Vorhandensein charakteristischer Symptome wie Ödembildung oder Ablösen von Zellen, analysiert und anschließend fotografiert.

### 3.3 Cytometric Bead Array (CBA)

#### 3.3.1 Prinzip

Diese immunologische Methode beruht auf der Messung der Fluoreszenzintensitäten eines Detektionsantikörpers bei einer bestimmten Wellenlänge (s. Abbildung 8). Das gemessene Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur Konzentration an Zytokin in der Lösung. Die sogenannten „beads“, mikroskopisch kleine Latexpartikel, binden zunächst das entsprechende Zytokin. An die gebundenen Zytokine lagert sich schließlich der Detektionsantikörper an und bildet so einen Sandwich-Komplex. Ungebundene Antikörper werden nach Ablauf der Reaktion durch einen Waschvorgang entfernt um sicherzustellen, dass nur spezifisch gebundene Antikörper zu einem Signal führen.

Gemessen wird das Fluoreszenz-Signal der *beads* einer bestimmten Größe, die wiederum für ein Zytokin zuständig ist. Da auch die *bead*-Größe erfasst wird, ist es möglich mehrere Zytokine simultan zu erfassen.



**Abbildung 8:** schematische Darstellung des CBA-Versuchsprinzips (mit freundlicher Genehmigung von BD Biosciences)

#### 3.3.2 Vorbereitung der Lösungen zur Erstellung einer Standardkurve

Zur Herstellung des *Top Standards* wurde in ein 15-mL-Röhrchen aus jedem Kit ein lyophilisiertes Standardpellett gegeben (insgesamt fünf Pellets für fünf zu messende Zytokine).

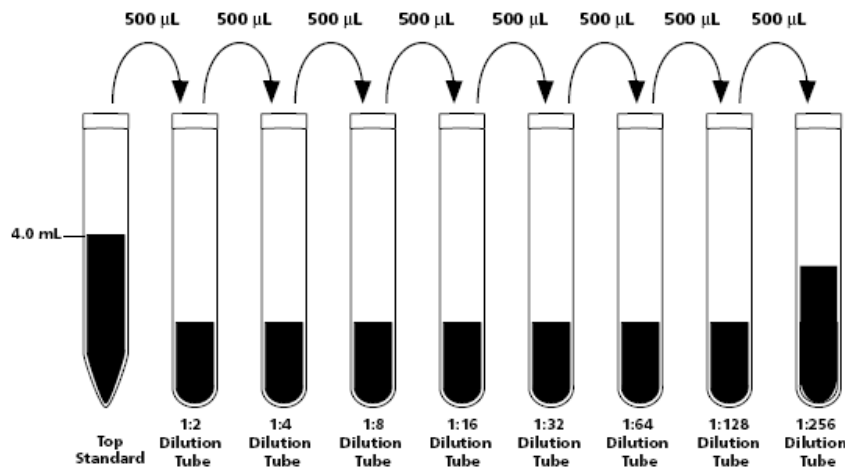
Dann wurden 4 mL Verdünnungslösung (*Assay Diluent*) hinzugegeben und vorsichtig mit Hilfe einer Pipette gemischt.

Je 500  $\mu$ L *Assay Diluent* (Verdünnungslösung) wurden in neun FACS Röhrchen gegeben. Danach wurde in das erste Röhrchen je 500  $\mu$ L des *Top Standards* gegeben und abermals mit der Pipette vorsichtig gemischt. Von der entstandenen Lösung wurden 500  $\mu$ L entnommen und in das darauffolgende FACS Röhrchen gegeben. Es wurde in gleicher Weise



bei den folgenden Röhrchen verfahren und so eine Verdünnungsreihe hergestellt (s. Abbildung 9).

Ein Röhrchen dient als Negativkontrolle und enthält nur *Assay Diluent*.



**Abbildung 9:** schematische Darstellung der Verdünnungsreihe (mit freundlicher Genehmigung von BD Biosciences)

### 3.3.3 Vorbereitung der Reagenzien

Für die Zytokin Messung wurde das *Cytometric Bead Array Flex Kit* der Firma BD Bioscience (Heidelberg/Deutschland) verwendet. Gemäß des Handbuchs, wurden für die zu messenden Zytokine nur 0,25  L *bead*-Suspension eingesetzt, insgesamt somit 1,25  L *bead*-Suspension da fünf Zytokine gemessen wurden (IL-1 , IL-1 , IL-8, GM-CSF und TNF- ).

Für 36 Proben und 10 Standardverdünnungen (insgesamt 46 Messungen), wurden pro Zytokin Kit 13,25  L *bead*-Suspension entnommen, zuvor wurden die Lagergef  e etwa 30 Sekunden gemischt unter Zuhilfenahme eines Vortexers.

Das Gesamtmessvolumen pro Messung betrug 12,5  L, abzüglich der 1,25  L *bead*-Suspension war somit ein Volumen von 11,25  L *Capture Bead Diluent* pro Probe (insgesamt somit 596,25  L) nötig um die *bead*-Suspension entsprechend zu verdünnen. Die gleichen Volumina wie für die *bead*-Suspension wurden gleichermaßen auch für die Fluoreszenzmarker eingesetzt (*Detection Reagent* und *Detection Reagent Diluent*).

### 3.3.4 Probenaufbereitung und Messung

Die Proben wurden aufgetaut, gemischt und anschließend kurz bei 900 rpm und 22 C abzentrifugiert um zelluläre Bestandteile abzutrennen, die die Messung stören könnten.

Anschließend wurden vom Überstand der Proben bzw. der Standardreihe 12,5 µL Lösung entnommen, in einen FACS-Röhrchen mit der gleichen Menge der vorbereiteten *bead*-Suspension gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden ebenfalls 12,5 µL Nachweisreagenz hinzugegeben, mit Hilfe einer Pipette durch auf- und abpipettieren gemischt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Im Anschluss daran wurden in jedes Teströhrchen 250 µL Waschpuffer gegeben und 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und abermals 150 µL Waschpuffer hinzugegeben.

Vor der Messung wurden die Proben kurz gevortext und anschließend in das FACS-Gerät zur Messung gestellt. Die Auswertung erfolgte mit BD CBA Software des Herstellers.

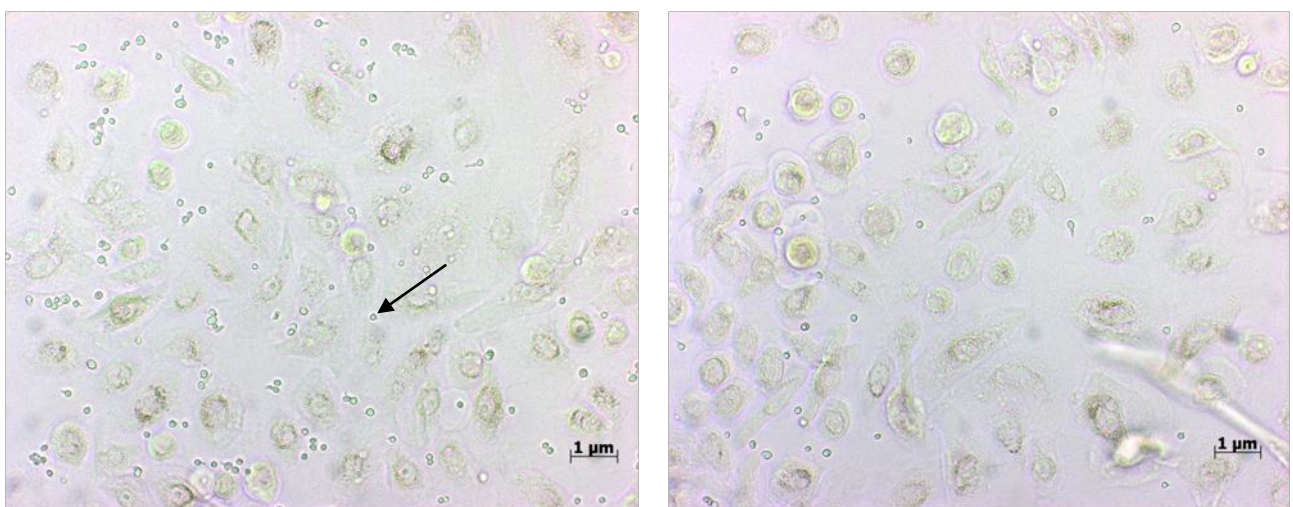
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Candida-Keratinozyten-Adhärenz-Assay

Diesem Versuch liegt die Arbeit von Ollert *et al.*, in der bereits 1993 ein Adhärenz Assay verwendet und beschrieben wurde [74].

Ziel ist es während einer Inkubation der Hefezellen mit einem Sap-Inhibitor, vor dem eigentlichen Versuch, die Ausschüttung von Sap-Enzymen zu hemmen. Im Anschluss wird die Adhärenz an primäre, humane, neonatale Epithelzellen untersucht. Da Sap 1-3 auch die Adhärenz beeinflussen, wird erwartet, dass aufgrund der Enzymhemmung durch die Sap-Inhibitoren, die Adhärenz an Epithelien vermindert ist. Eine verringerte Anzahl an angelagerten *Candida*-Zellen an den epithelialen Monolayer würde dann mit einer möglicherweise verringerten Virulenz des Erregers einhergehen, da der erste Schritt in der Infektionskaskade unterbunden wird [91, 97, 99].

Alle Versuche wurden für jeden Inhibitor vier-Mal durchgeführt, wobei Pepstatin A immer als Referenz dient und daher die doppelte Anzahl an Versuchsergebnissen zur Verfügung steht. Als Vergleich dienen die Werte der PBS-Gruppe, der keinerlei Inhibitoren zugesetzt worden waren und die gleiche Menge *Candida*-Zellen enthielten wie die Testlösungen mit Sap-Inhibitoren. Eine Negativkontrolle ohne *Candida* erfolgte ebenfalls. Sie diente dazu eine Übertragung von *Candida*-Zellen durch den Versuchsaufbau auszuschließen. Ebenfalls getestet wurden Methanol-Kontrollen, die die gleiche Menge Methanol enthalten, wie die Inhibitor-Lösungen, bei denen es als Lösungsmittel fungiert.

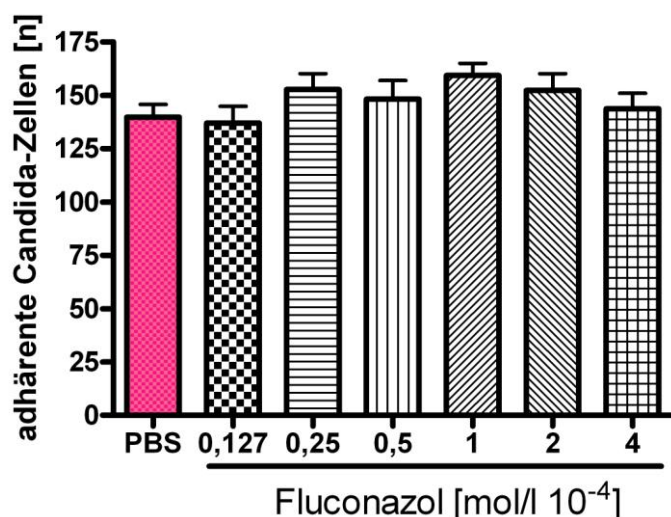


**Abbildung 10:** Keratinozyten-Monolayer mit darauf anhaftenden *Candida*-Zellen im Invertmikroskop bei x400 Vergrößerung, links: PBS-Kontrollgruppe ohne Inhibitoren, rechts: nach Inkubation mit Inhibitor M 0,5 mol/l, die PBS-Gruppe weist wesentlich mehr anhaftende *Candida*-Zellen auf als die Testgruppe mit Inhibitor M obwohl die gleiche Anzahl an Candidazellen zuvor auf den Monolayer aufgetragen wurden (Pfeil zeigt *Candida*-Zelle)

#### 4.1.1 Fluconazol

Fluconazol, als etabliertes Antimykotikum, wirkt fungizid und fungistatisch, in dem es Einfluss auf die Ergosterol-Synthese nimmt und damit die Membranintegrität nachhaltig zu stören vermag. In bisherigen Untersuchungen konnte kein Einfluss auf Sap nachgewiesen werden.

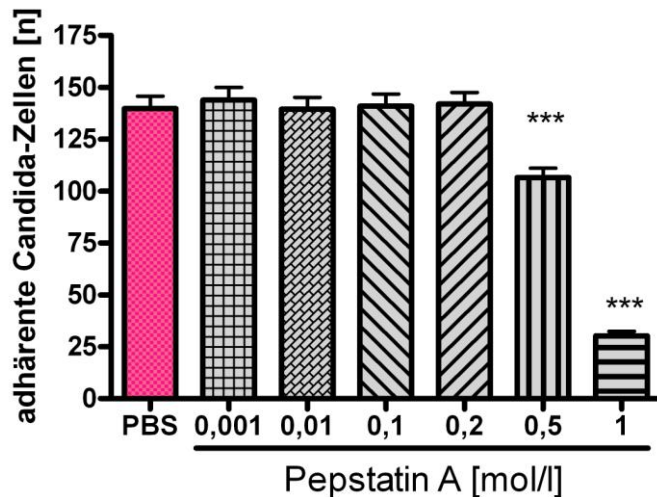
Im *Candida*-Keratinozyten-Adhärenz-Assay konnte gezeigt werden, dass keine der eingesetzten Fluconazol-Konzentrationen die Anheftung der Hefezellen signifikant zu hemmen vermag (s. Abbildung 11). Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von 64 ng/mL für den hier verwendeten Wildtypstamm SC5314, wurde bereits in früheren Untersuchungen ermittelt. Sowohl diese als auch die höhere Konzentrationen führten nicht zu einer verminderten Anheftung.



**Abbildung 11:** Anzahl anhaftender *Candida*-Zellen nach Zugabe verschiedener Fluconazol-Konzentrationen im Vergleich zur PBS-Kontrolle im *Candida*-Keratinozyten-Adhärenz-Assay es konnten in keiner Konzentration eine veränderte Adhärenz der *Candida*-Zellen festgestellt werden

#### 4.1.2 Pepstatin A

Pepstatin A ist, wie bereits erwähnt, ein bekannter Inhibitor der sekretorischen Aspartat-Proteinasen und gilt als Goldstandard zur Hemmung dieser Proteinasen. Bei den beiden höchsten Konzentrationen von Pepstatin A wurde die Anlagerung an einen Monolayer aus primären, neonatalen Keratinozyten in den Konzentrationen 0,5 mol/l und 1 mol/l signifikant gehemmt. In den anderen, niedrigeren Konzentrationen war keine Verminderung der Adhärenz nachweisbar (s. Abbildung 14).



**Abbildung 12:** Anzahl anhaftender *Candida*-Zellen nach Zugabe verschiedener Pepstatin A-Konzentrationen im Vergleich zur PBS-Kontrolle im *Candida*-Keratinocyten-Adhärenz-Assay; die beiden höchsten Konzentrationen zeigen eine signifikante Abnahme adhärenter Hefezellen

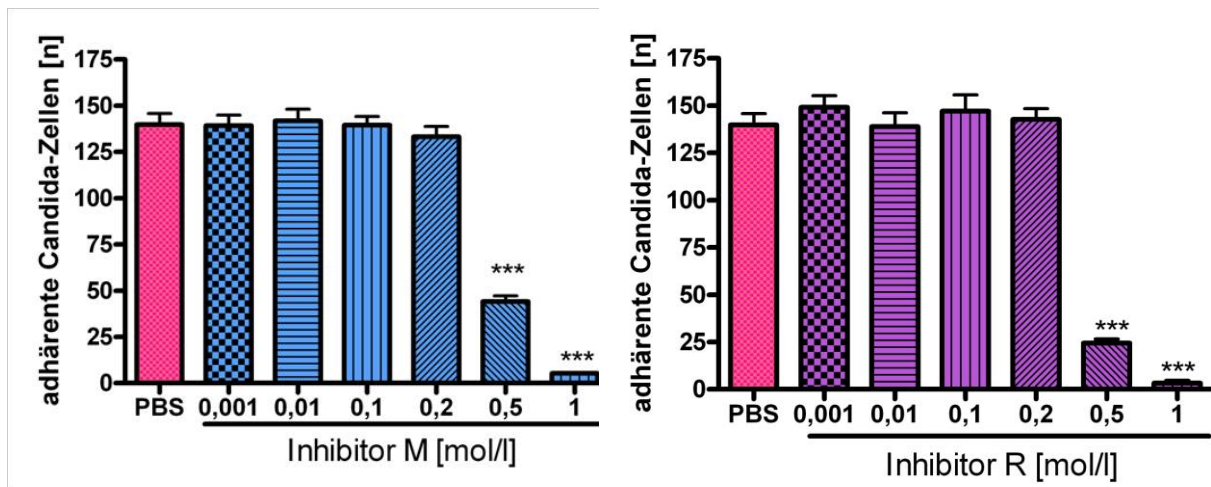
#### 4.1.3 Inhibitor M

Da die verwendeten neuen Inhibitoren von der Struktur des Pepstatin A abgeleitet sind, wird erwartet, dass auch Inhibitor M als Hemmstoff der Sap wirkt. Mit Hilfe des hier angewendeten Verfahrens konnte eine signifikante Hemmung für die beiden, in diesem Fall höchsten, eingesetzten Konzentrationen von 0,5 mol/l und 1 mol/l nachgewiesen werden. Die Hemmung der *Candida*-Adhärenz durch Pepstatin A lag ebenfalls bei 0,5 mol/l und 1 mol/l. Inhibitor M war in der Lage die Anzahl anhaftender *Candida*-Zellen im Vergleich zu Pepstatin A noch weiter zu verringern, auf ca. 50% des Wertes von Pepstatin A, (s. Abbildung 14). Die geringeren Konzentrationen (0,001 mol/l; 0,01 mol/l; 0,1 mol/l und 0,2 mol/l) zeigten keine statistisch signifikante Verminderung angelagerter *Candida*-Zellen.

#### 4.1.4 Inhibitor R

Die eingesetzten Konzentrationen von Inhibitor R sind mit denen von Inhibitor M und Pepstatin A identisch. Wie auch schon bei Pepstatin A und Inhibitor M, konnte für Inhibitor R eine signifikant erniedrigte Adhärenz in den beiden höchsten Konzentrationen 0,5 mol/l und 1 mol/l gezeigt werden. Die Anzahl angehefteter *Candida*-Zellen war signifikant niedriger als die, die in der Pepstatin A-Gruppe beobachtet werden konnten und nochmals geringer als die von Inhibitor M. Der getestete Inhibitor R ist somit der Kont-

rollsubstanz, Pepstatin A, und der anderen Testsubstanz Inhibitor M, in diesem Versuch überlegen (s. Abbildung 14).



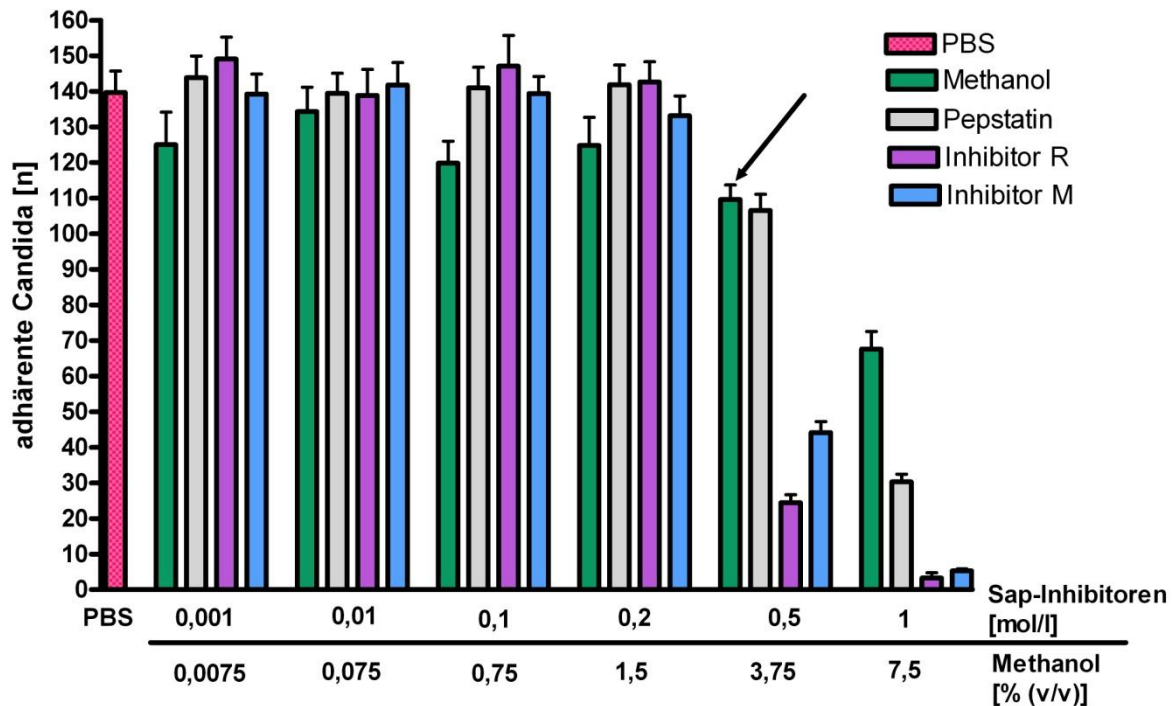
**Abbildung 13:** Anzahl anhaftender *Candida*-Zellen nach Zugabe von rechts: Inhibitor M und links: Inhibitor R in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur PBS-Kontrolle im *Candida*-Keratinocyten-Adhärenz-Assay; die beiden höchsten Konzentrationen zeigen jeweils eine signifikante Abnahme adhären-ter Hefezellen

#### 4.1.5 Einfluss des Lösungsmittel Methanol auf die Anlagerung von *Candida*-Zellen an Keratinozyten-Monolayer

Wie in Abbildung 14 zu erkennen, ist das Lösungsmittel Methanol in den eingesetzten Konzentrationen der Inhibitor-Lösungen auch allein für eine verminderte Anlagerung von *Candida albicans* verantwortlich. Erst ab einer Menge von 3,75% (v/v) und 7,5% (v/v) zeigt sich dieser Effekt als statistisch signifikant und entspricht damit den Mengen in den beiden höchsten Sap-Inhibitor-Konzentrationen. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Anzahl adhären-ter *Candida*-Zellen bei den eingesetzten, neuentwickelten Inhibitoren wiederum signifikant geringer ist, als die der entsprechenden Methanolkonzentrationen. Nur für eine Testgruppe: Pepstatin A 0,5 mol/l, ist die Anzahl adhären-ter Hefezellen nicht signifikant verschieden von der des Lösungsmittels Methanol in der eingesetzten Konzentration von 3,75% (v/v). D. h. Methanol vermindert im gleichen Ausmaß die Anlagerung von Hefezellen an Keratinozyten, wie es Pepstatin A tut. Die Wirkung der Referenzsubstanz Pepstatin A ist daher nicht allein der Substanz sondern u. U. auch dem Lösungsmittel zuzusprechen (siehe Pfeil in Abbildung 14). Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der Konzentration von 0,5 mol/l Pepstatin A um einen Lösungsmittelleffekt handelt.

Für die neuen Inhibitoren in den hemmenden Konzentrationen, 0,5 mol/l und 1 mol/l, ist die Anzahl der anheftenden Pilzzellen jedoch signifikant geringer als die der korres-

pondierenden Methanolkonzentration. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Lösungsmittelleffekt in diesen eingesetzten Konzentrationen vernachlässigt werden kann. Und vor allem für die höhere Konzentration, von 1 mol/l und für alle Sap-Inhibitoren (Pepstatin, Inhibitor R und M) nicht zum Tragen kommt.



**Abbildung 14:** Gesamtübersicht der Ergebnisse des *Candida*-Keratinocyten-Adhärenz-Assays, aufgetragen ist die absolute Anzahl anhaftender *Candida*-Zellen (als Mittelwert mit dessen Abweichung) nach Inkubation mit der jeweiligen Konzentration eines Sap-Inhibitors bzw. mit korrespondierender Methanolkontrolle,

Pfeil zeigt Lösungsmittelleffekt von Pepstatin A 0,5 mol/l und Methanol 3,75% (v/v), das in gleicher Menge als Lösungsmittel enthalten ist, als statistisch signifikant. Für 0,5 mol/l und 1 mol/l Sap-Inhibitoren verringert sich die Anzahl anhaftender Hefezellen, wobei die neuen Inhibitoren dem Goldstandard Pepstatin A überlegen sind. Inhibitor R verringert am potentesten die Anlagerung von Hefezellen an Keratinocyten.



## 4.2 Versuchsdesign und Laktat-Dehydrogenase Bestimmung im Hautkonstrukt Experiment

Der Versuchsaufbau und die Durchführung der Hautkonstrukt-gestützten Experimente orientierten sich vor allem an bereits durchgeführten Experimenten der Arbeitsgruppe mit Hautmodellen [8, 52, 93, 94, 98, 101].

Für diesen Versuch wurden kommerziell erhältliche Modelle humaner oraler Schleimhaut mit einer definierten Menge *Candida*-Zellen infiziert, die zuvor mit Inhibitoren der Sap (Pepstatin A oder neuentwickelte Inhibitoren) bzw. Fluconazol als breitbekanntes Antimykotikum inkubiert wurden, um deren Einfluss auf die Pathogenese der Kandidose zu untersuchen.

Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde je Versuchsgruppe und Konzentration ein Hautkonstrukt mit Hilfe eines Skalpells aus dem *Insert* herausgeschnitten und das Versuchsmedium zur Laktat-Dehydrogenase-Bestimmung und Zytokin-Messung entnommen, um den Schaden durch *Candida* auf biochemischer als auch histologischer Ebene zu untersuchen. Der Versuch wurde insgesamt sechs Mal wiederholt (dreimal für jede Substanz und insgesamt sechsmal für Pepstatin A).

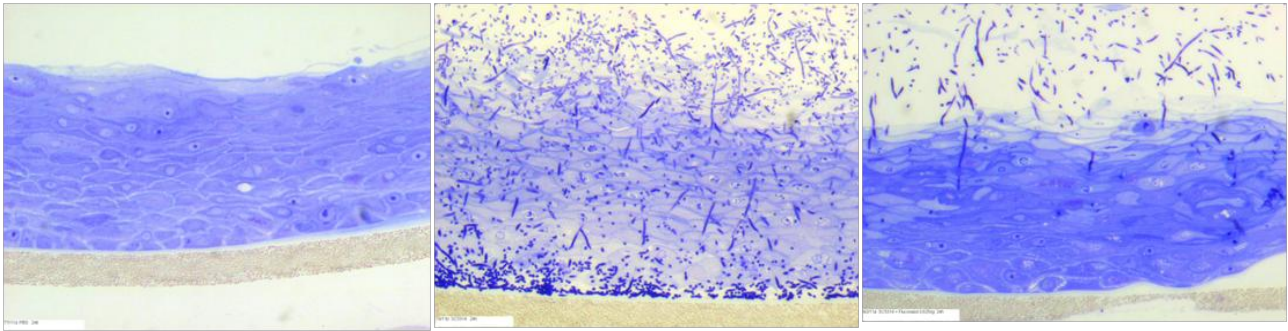
Zur Quantifizierung der Schädigung des Hautkonstrukts wurde unter anderem die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt und mit der Positivkontrolle des Wildtyp SC5314 allein ins Verhältnis gesetzt, d. h. der Mittelwert des Wildtyps entspricht 100% der relativen LDH-Aktivität.

Dadurch ergaben sich die relativen LDH-Aktivitäten. Diese ist insbesondere geeignet, da eventuelle Unterschiede zwischen den Versuchstagen eliminiert werden und trotz größerer Streuung der Absolutwerte, die Relativwerte der Experimente gut vergleichbar waren.

Die Laktat-Dehydrogenase wird erst durch die Zelllyse freigesetzt. Es ist somit davon auszugehen, dass die gemessene Aktivität proportional zu dem Schaden ist, der aufgrund von *Candida albicans* verursacht wurde.

Der histologische Schaden der durch *Candida albicans* beobachtet werden kann, reicht von Spongiose und Ödemen einzelner Zellen, bis zu Para- und Hyperkeratose. Charakteristisch ist auch die Bildung einer Pseudomembran. Diese Pseudomembran besteht aus Hefezellen und abgestorbenen Epithelzellen und ist bereits 24 Stunden post Infektion mikroskopisch und makroskopisch sichtbar.





**Abbildung 15:** mikroskopische Aufnahmen bei Vergrößerung x400, nach 24 Stunden Inkubation, Färbung erfolgte mit 1:1-Mischung aus 1% Pyronin G-Lösung und 1% Toludinblau

Links: Hautkonstrukt behandelt mit PBS allein, Mitte: Hautkonstrukt mit *Candida albicans* Typ SC5314 ohne Inkubation mit Sap-Inhibitoren, Rechts: Hautkonstrukt infiziert mit *Candida albicans* nach erfolgter Inkubation mit Fluconazol 0,5 mol/l \* 10<sup>-4</sup>

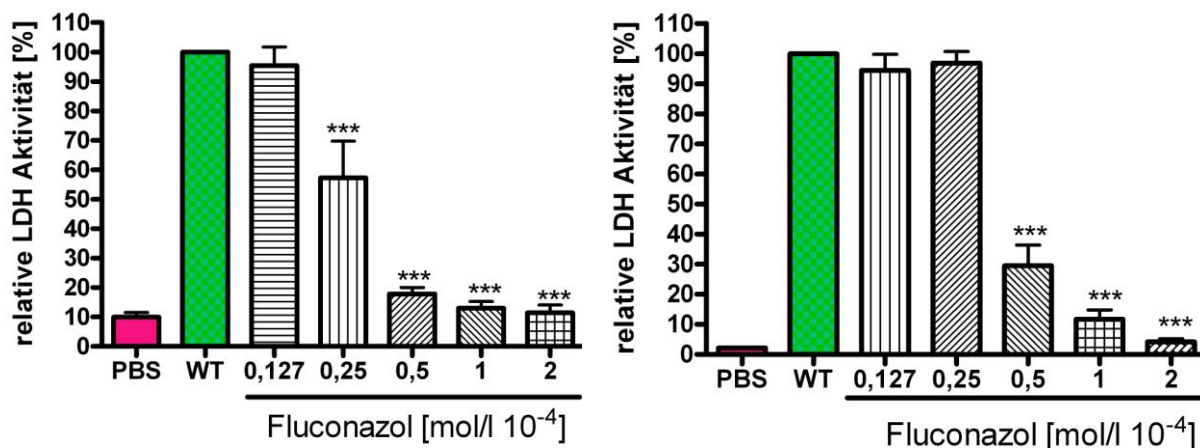
Im Gegensatz zum linken Bild zeigt die Abbildung in der Mitte einen massiven *Candida*-befall. Die oberste Zellschicht hat sich bereits abgelöst (Pseudomembranbildung). Außerdem sind Ödeme und das Auflösen der Kittsubstanz zwischen den Einzelzellen bereits weit fortgeschritten. Die *Candida*-Zellen haben das Gewebe bereits durchwandert, die völlige Ablösung von der Trägerschicht hat begonnen. In der rechten Abbildung zeigt sich eine wesentlich abgeschwächter Verlauf. Eine Pseudomembran ist noch nicht ausgebildet, obwohl die obersten Zelllagen bereits angegriffen sind, was an der helleren Färbung sichtbar ist. Der Farbstoff konnte nicht mehr von diesen Zellen aufgenommen werden. Die Spongiose/ Ödembildung der Zellen ist bereits erkennbar, wobei die Zellintegrität jedoch noch vollständig erhalten ist.

#### 4.2.1 Fluconazol

Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) für Fluconazol wurde in unserer Klinik bereits im Rahmen früherer Versuche für den hier verwendeten Wildtyp bestimmt und liegt bei 64 ng/mL. Ausgehend von der MHK, wurden sowohl diese Konzentration als auch je zwei höhere und zwei niedrigere Konzentrationen untersucht.

Es zeigte sich, dass nach 24 Stunden in der niedrigsten Konzentration keine signifikant geringere Aktivität der LDH gemessen wurde im Vergleich zur Positivkontrolle mit *Candida albicans* allein (s. Abbildung 16). Im Gegensatz dazu, zeigte die nächste Konzentration (0,25 mol/l \* 10<sup>-4</sup>) eine niedrigere LDH-Aktivität als die Kontrollgruppe PBS. Ab der mittleren eingesetzten Konzentration, konnte ein noch deutlicherer Rückgang der LDH-Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dies geht auch mit einem verringerten Schadensausmaß einher, der gleichfalls makroskopisch wie auch mikroskopisch sichtbar war. Bei beiden höchsten Fluconazol-Mengen von 1 und 2 mol/l \* 10<sup>-4</sup> wurden die geringsten LDH-Aktivitäten gemessen.

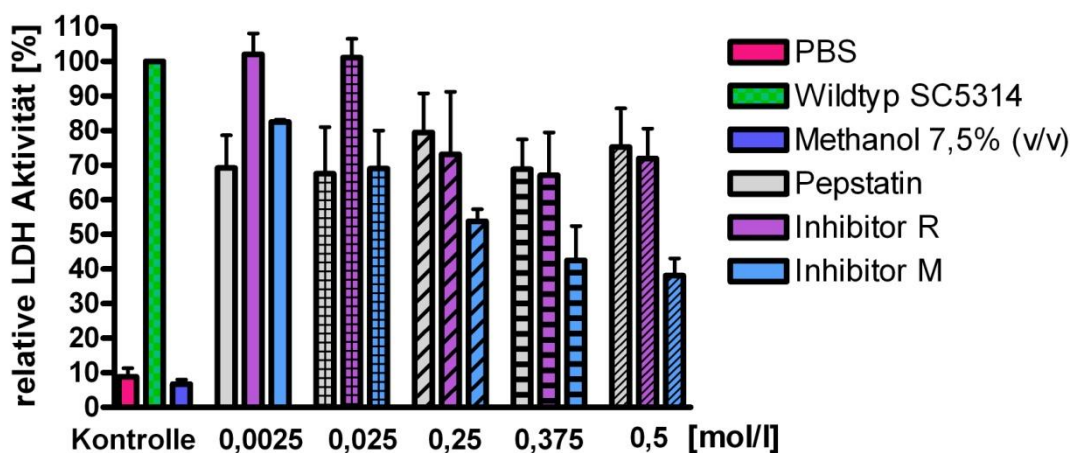
Diese beiden Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle mit PBS allein. Fluconazol zeigte somit in diesen Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubationszeit einen starken inhibierenden Effekt, so dass das Schadensbild mit dem der Kontrollgruppe mit PBS allein übereinstimmt.



**Abbildung 16:** relative Aktivität der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Hautkonstrukt-Experiment nach Inkubation mit PBS allein (PBS), Candida SC5314 (WT) und verschiedenen Konzentrationen Fluconazol nach 24 Stunden (rechts) und 48 Stunden (links) ; \*\*\*P-Wert<0,001

Im Gegensatz dazu konnte nach 48 Stunden nur bei den drei höchsten Konzentrationen eine verminderte LDH-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (WT) allein festgestellt werden (s. Abbildung 16). Es fällt auf, dass am zweiten Inkubationstag die LDH-Aktivitäten der Fluconazol-Gruppe im Allgemeinen höher ausfallen, als im Vergleich zum Vortag.

#### 4.2.2 Pepstatin A und Sap-Inhibitoren



**Abbildung 17:** Übersicht über Mittelwerte der relative LDH-Aktivität des Hautkonstrukts nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Sap-Inhibitoren nach 24 Stunden, PBS = ohne *Candida* und Inhibitoren; Wildtyp = ohne Inhibitoren, nur mit *Candida*; Methanol 7,5% = höchste eingesetzt Methanolkonzentration korrespondiert mit der Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l, ohne *Candida*

Die Sap-Inhibitoren zeigen nach 24 Stunden Inkubationszeit, bis auf zwei Ausnahmen (die beiden niedrigsten Konzentrationen von Inhibitor R), alle eine signifikant geringere LDH-Aktivität, als der Wildtyp SC5314 allein (s. Abbildung 17).

In Bezug auf Pepstatin A (graue Säulen), konnte nur für die Konzentrationen 0,0025 mol/l; 0,25 mol/l und 0,375 mol/l auch eine statistisch signifikant niedrigere LDH-Aktivität gemessen werden.

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass Pepstatin A allein, keinen Effekt auf die LDH-Aktivität hat. Die gemessenen Werte bewegten sich dann im Bereich der Negativ-Kontrolle PBS. Wurde Methanol allein mit Candida-Zellen aufgetragen, so waren die gemessenen LDH-Werte vergleichbar mit denen des Wildtyps ohne Methanol.

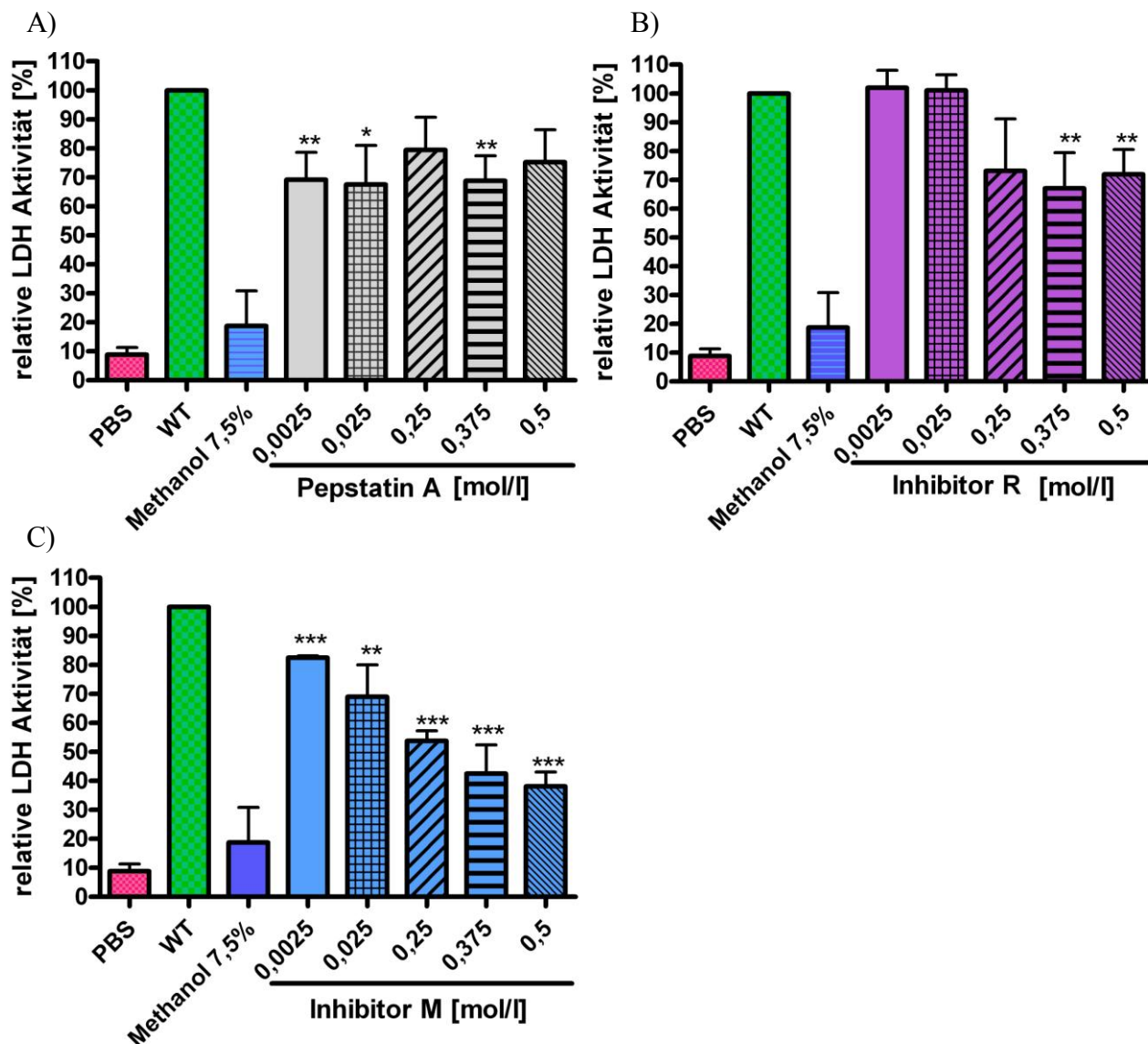
Für die getesteten neuen Inhibitoren ergibt sich für Inhibitor R eine signifikant geringere LDH-Aktivität in den beiden höchsten Konzentrationen, 0,375 mol/l und 0,5 mol/l. Obwohl zu erkennen ist, dass bereits 0,25 mol/l eine geringere LDH-Aktivität zeigt, so ist diese statistisch nicht signifikant, wie in Abbildung 18, B) zu erkennen ist.

Inhibitor M zeigte in allen Konzentrationen eine signifikant geringere Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp allein. Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase nimmt proportional mit steigender Inhibitor-Konzentration ab. Die höchste Konzentration weist somit die geringste Enzymaktivität auf. Eine Stagnation ist dabei nicht zu erkennen (*steady state*). Es ist somit anzunehmen, dass eine höhere Inhibitor-Konzentration ggf. auch mit einer noch geringeren LDH-Aktivität und damit verbundenem geringerem Schaden einhergeht.

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Inhibitoren in wässrigen Lösungsmitteln war jedoch eine höhere Konzentration ohne erhöhten Methanolgehalt nicht möglich. Ein erhöhter Methanolgehalt wiederum hätte, wie im Adhärenz-Assay bereits erwähnt, hingegen selbst Auswirkungen auf die Adhärenz der Candida-Zellen gehabt (vgl. 4.1.5).

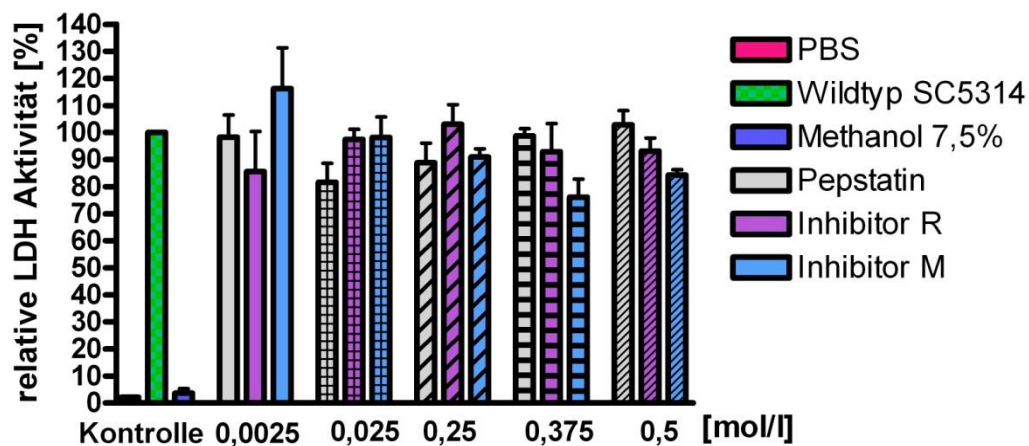
Bei einer Konzentration von 0,5 mol/l Inhibitor M liegt die Enzymaktivität unter 50% im Vergleich zur Positivkontrolle und ist gleichzeitig auch die Konzentration mit der die Schädigung am besten unterbunden werden konnte. Eine eindeutig dosisabhängige Reduktion des Schadens konnte für Inhibitor M nachgewiesen werden (s. Abbildung 18).

Die gefundenen Werte für Inhibitor M liegen in den beiden höchsten Konzentrationen 0,375 mol/l und 0,5 mol/l signifikant unter denen für Inhibitor R. Inhibitor M ist somit in diesem Experiment als der Potenteste Wirkstoff einzustufen.



**Abbildung 18:** relative Aktivität der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase im Hautkonstruktversuch nach Behandlung mit PBS allein (PBS), Candida SC5314 (WT) nach 24 Stunden Inkubationszeit mit A) Pepstatin, B) Inhibitor R, C) Inhibitor M; Methanol 7,5% = höchste eingesetzt Methanolkonzentration korrespondiert mit der Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/L ohne Candida; P-Werte: \* <0,05 – 0,01; \*\* 0,01 – 0,001; \*\*\* >0,001

Nach 48 Stunden Inkubationsdauer wurden für Pepstatin A nur für die geringste Konzentration von 0,0025 mol/l eine signifikant geringere Enzymaktivität nachgewiesen werden (s. Abbildung 19). Inhibitor R zeigte für keine der getesteten Konzentrationen eine signifikant geringere LDH-Aktivität, dabei waren alle gemessenen Werte in etwa gleich hoch. Bei Inhibitor M wurde in den beiden höchsten Konzentrationen eine geringere LDH-Aktivität nachgewiesen als mit *Candida* allein, bei 0,5 mol/l stieg die Enzymaktivität jedoch wieder an.



**Abbildung 19:** Übersicht über Mittelwerte der relativen LDH-Aktivität des Hautkonstrukts nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Sap-Inhibitoren nach 48 Stunden, PBS = ohne *Candida* und Inhibitoren; Wildtyp = ohne Inhibitoren, nur mit *Candida*; Methanol 7,5% = höchste eingesetzte Methanolkonzentration korrespondiert mit der Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l, ohne *Candida*

### 4.3 Cytometric Bead Array (CBA)

Mit Hilfe des CBA ist es möglich, mehrere Zytokine simultan zu erfassen. Die *beads*, mikroskopisch kleine Latexpartikel, unterscheiden sich je nach zu erfassendem Zytokin in ihrer Größe. Sie werden durch das Durchflusszytometer (FACS) ihrer Größe nach aufgetrennt, während gleichzeitig das dazugehörige Fluoreszenz-Signal mit Hilfe eines Detektors erfasst wird. Dieses Fluoreszenz-Signal ist wiederum proportional zur gebundenen Menge an Zytokin.

Gemessen wurden pro-inflammatorische Zytokine die mit einer *Candida*-Infektion der Haut und Schleimhaut korrelieren und in der frühen Immunantwort freigesetzt werden [27, 97, 98, 114]. Durch die Sezernierung der verschiedenen Zytokine kommt es zu einer Entzündungsantwort, die die Freisetzung weiterer Entzündungs-Mediatoren fördert, unterschiedliche Immunzellen aktiviert (wie z. B. Lymphozyten, dendritische Zellen und Mastzellen) und diese zum Infektionsort locken [7, 105]. Außerdem fördern oder aktivieren sie ihre Bildung, Freisetzung und Aktivierung auch gegenseitig [4, 7, 24, 27].

Interleukin 1 (IL-1) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, wobei unter anderem zwei Hauptformen unterschieden werden, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Die Freisetzung von IL-1 in das Kulturmedium tritt bei oberflächlichen Kandidosen vornehmlich aufgrund von Zelllyse auf. Dies ist auch der Grund, weshalb sich IL-1-Werte proportional zu LDH-Werten verhalten, da LDH ebenfalls beim Untergang der Epithelzellen frei wird [27]. Beide IL-1-Proteine werden zunächst als Vorstufen gebildet und hauptsächlich im Zytosol gespeichert. Durch intrazelluläre Proteasen können die Moleküle schließlich in die aktive Form umgewandelt werden. Dieser Prozess kann auch durch extrazelluläre Enzyme ablaufen, z. B. nach einer Zelllyse durch natürlich vorkommende Enzyme im Zellzwischenraum oder, wie in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau, durch freie Sap [5, 24, 55].

Die Freisetzung von Interleukin 8 (IL-8) wird von IL-1 $\alpha$  gefördert und wurde im Zusammenhang mit Kandidosen ausschließlich bei erkrankten Patienten, nicht aber bei gesunden Trägern des Keims nachgewiesen [97].

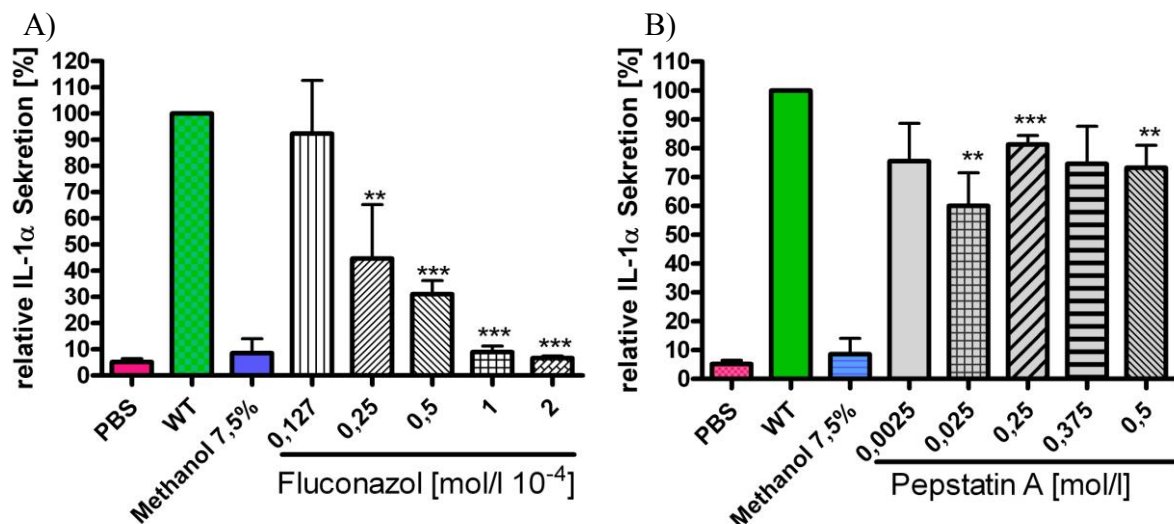
Die Sekretion von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem-Faktor (GM-CSF) vermindert den Gewebeschaden durch *Candida albicans* indem es den intrazellulären, oxidativen Metabolismus steigert und so zur Erhöhung phagozytierender Eigenschaften von Immunzellen führt [4].



### 4.3.1 Sezernierte Interleukin-Mengen nach 24 Stunden Inkubationszeit im Hautkonstrukt-gestützten Experiment

Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ):

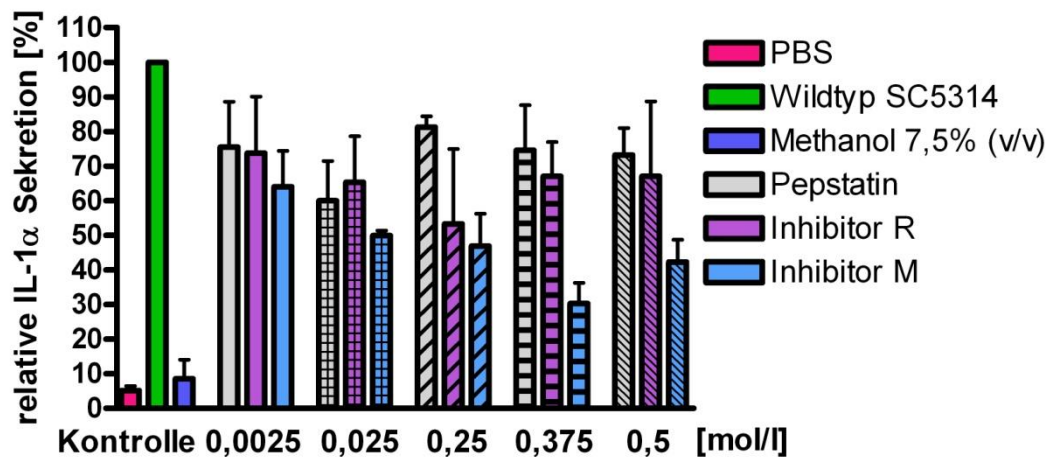
Nach 24 Stunden Inkubationszeit, zeigte Fluconazol bereits in der zweitniedrigsten Konzentration von 0,25 mol/l  $\cdot 10^{-4}$  eine signifikant geringere IL-1 $\alpha$  Konzentration. Auch alle höheren Fluconazol-Mengen waren in der Lage, die gebildeten Interleukin-1 $\alpha$  Mengen signifikant zu verringern. Es konnte eine dosisabhängige, schrittweise Abnahme der Interleukin-1 $\alpha$  Freisetzung nachgewiesen werden (s. Abbildung 20). Wie bereits bei der LDH-Aktivität, sind die IL-1 $\alpha$  Werte der beiden höchsten Fluconazol-Konzentrationen nicht verschieden von der der Negativkontrolle mit PBS ohne *Candida*.



**Abbildung 20:** relative Interleukin-1 $\alpha$  Konzentration nach 24 Stunden Inkubationszeit im Medium des Hautkonstrukt A): Fluconazol, B): Pepstatin A mit dazugehörigen Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, WT = *Candida* ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida*, Konzentration korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l Pepstatin A; P-Werte: \* <0,05 – 0,01; \*\* 0,01 – 0,1; \*\*\*>0,001

Alle Sap-Inhibitoren wiesen eine geringere Konzentration von IL-1 $\alpha$  auf, als die Positivkontrolle mit *Candida*-Zellen allein. Die Pepstatin A-Gruppe zeigt für die Konzentrationen 0,025 mol/l, 0,25 mol/l und 0,5 mol/l eine signifikant geringere Zytokin-Menge im Vergleich zur WT-Gruppe mit *Candida albicans* allein, nicht jedoch für 0,375 mol/l und die niedrigste Konzentration von 0,0025 mol/l (s. Abbildung 20). Für die beiden innovativen Inhibitoren M und R konnte zunächst eine dosisabhängige Abnahme der IL-1 $\alpha$  Menge im Medium gezeigt werden, die statistisch signifikant ist. Bei höheren Konzentrationen ist jedoch wieder ein Anstieg der relativen IL-1 $\alpha$ -Werte nachweisbar.

Die gemessenen IL-1 $\alpha$ -Konzentrationen waren außerdem bis auf eine Ausnahme (Inhibitor R 0,025 mol/l) stets geringer als die von Pepstatin A (s. Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Gesamtübersicht der relative Interleukin-1 $\alpha$  Freisetzung der Sap-Inhibitoren nach 24 Stunden Inkubationszeit im Medium des Hautkonstrukts mit dazugehörigen Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, Wildtyp = ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/L der Sap-Inhibitoren

Die niedrigste IL-1 $\alpha$  Konzentration konnten für Inhibitor R bei 0,25 mol/l, bzw. 0,375 mol/l Inhibitor M, gemessen werden und stieg anschließend wieder an. Bei 0,375 mol/l waren die gefundenen Interleukin-1 $\alpha$  Mengen für beide Inhibitoren noch signifikant unter der gefundenen Konzentrationen der Wildtyp-Kontrolle. Die höchste Inhibitor R Konzentration mit 0,5 mol/l konnte zwar noch geringer Wert als für den Wildtyp allein nachgewiesen werden, jedoch war dieser nicht mehr statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Sap-Inhibitor, mit *Candida* allein. Die Werte der IL-1 $\alpha$  Freisetzung für Inhibitor M liegen unter denen für Inhibitor R, allerdings ist dieser Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren, nicht statistisch signifikant. Es zeigt sich, wie bereits im LDH-Test auch, dass auch für die Interleukin-1 $\alpha$  Sekretion Inhibitor M der potentiell stärkere Inhibitor ist.

### Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Fluconazol zeigt wie bereits für IL-1 $\alpha$  und LDH eine dosisabhängige Wirkung und damit verbunden eine auch konzentrationsabhängige Abnahme der IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Für die niedrigste Konzentration konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Die anderen Konzentrationen hingegen zeigten für IL-1 $\beta$ , eine statistisch signifikant geringere Menge als der Wildtyp allein (s. Abbildung 22).

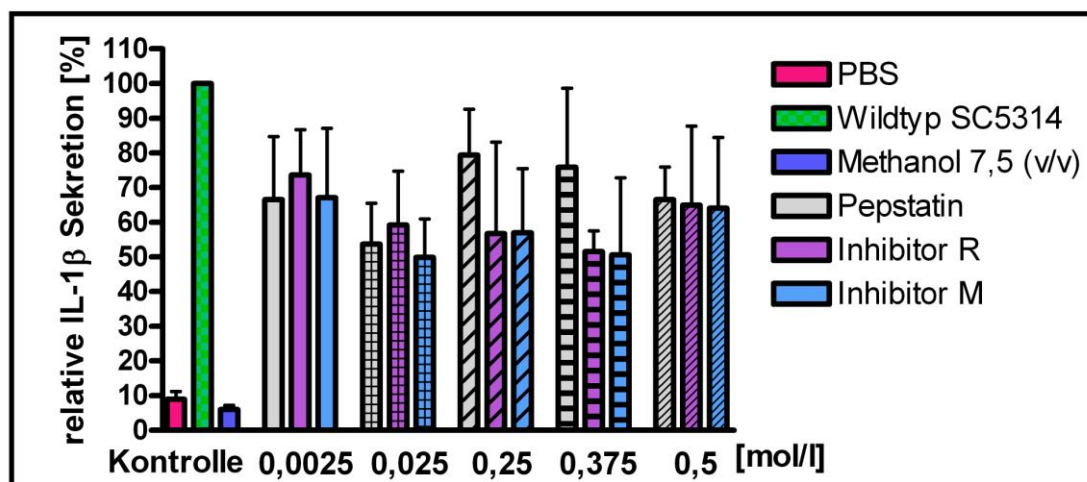


Für alle Konzentrationen des Pepstatin A konnte eine geringere Freisetzung als die Kontrolle mit *Candida* allein nachgewiesen werden. Statistisch signifikant ist dies jedoch nur für die Werte von 0,25 mol/l und 0,5 mol/l Pepstatin, nicht für die übrigen (s. Abbildung 22).

Auch die gemessenen Konzentrationen der neuentwickelten Inhibitoren liegen alle unter denen der Kontrollgruppe mit *Candida* ohne Inhibitoren. Die IL-1 $\beta$  Werte für Inhibitor M liegen dabei immer etwas unter denen von Inhibitor R bzw. im Fall von 0,25 mol/l gleich auf (s. Abbildung 22).

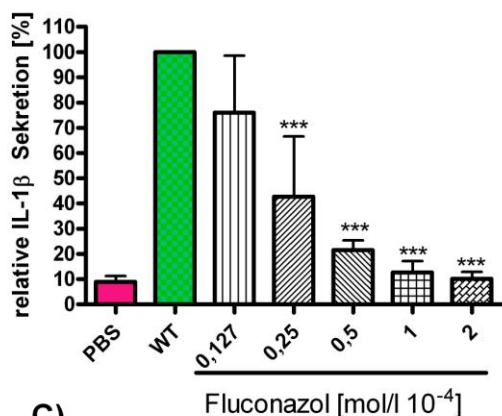
Zunächst nimmt die gebildete Menge an pro-inflammatorischem Zytokin für beide neuen Inhibitoren ab, zeigt dann eine Plateau Phase während welcher die Werte in etwa gleich hoch sind. Die Plateau Phase ist im Bereich von 0,25 mol/l bis 0,375 mol/l, bei einer Höhe von etwa 50% der WT-Kontrollgruppe und nimmt dann bei 0,5 mol/l wieder zu. Bei Inhibitor R ist die Zunahme so groß, dass die Menge nicht mehr statistisch signifikant verschieden von der Kontrollgruppe mit *Candida* ohne Sap-Inhibitoren ist. Im Gegensatz zu den Interleukin-1 $\alpha$  und LDH-Werten fällt auf, dass die Mittelwertsabweichungen höher sind.

## Übersicht Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) Sekretion nach 24 Stunden Inkubationszeit

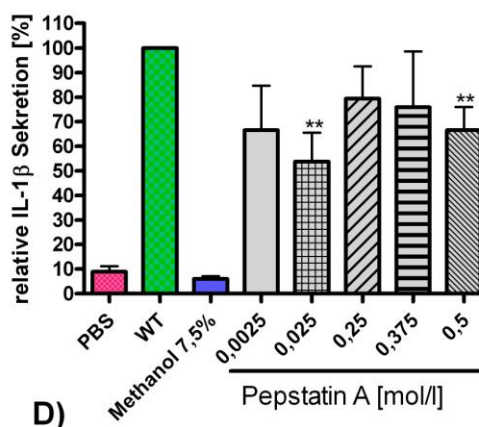


Detailansicht der einzelnen Graphen:

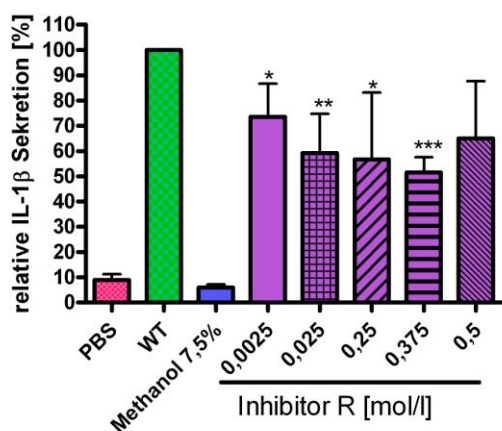
A)



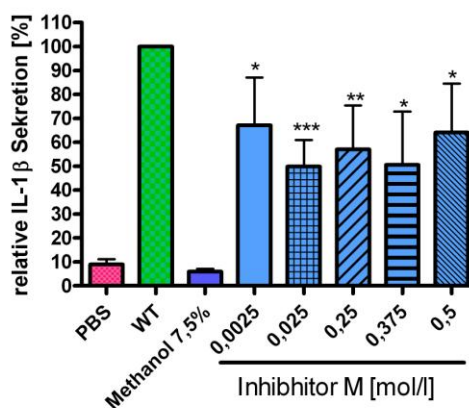
B)



C)



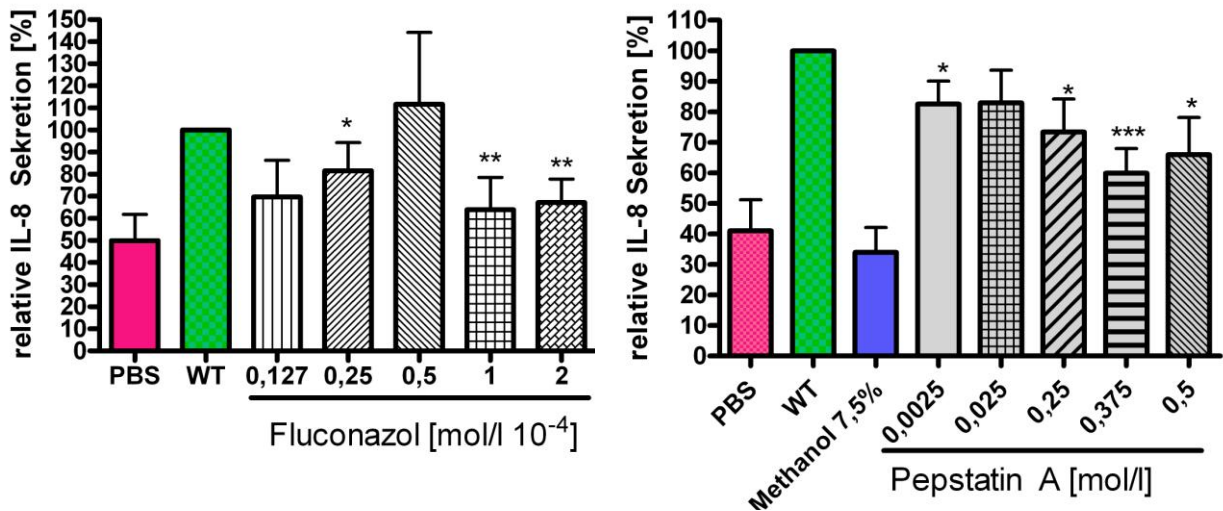
D)



**Abbildung 22:** Übersicht der relativen Interleukin-1 $\beta$  Freisetzung im Medium des Hautkonstrukts während 24 Stunden Inkubationszeit, ganz oben: Übersicht mit Sap-Inhibitoren, A) Fluconazol, B) Pepstatin, C) Inhibitor R, D) Inhibitor M und Kontrollen PBS = ohne *Candida*, Wildtyp = *Candida*-Zellen ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren; P-Werte: \* <0,05 – 0,01; \*\* 0,01 – 0,001; \*\*\* >0,001

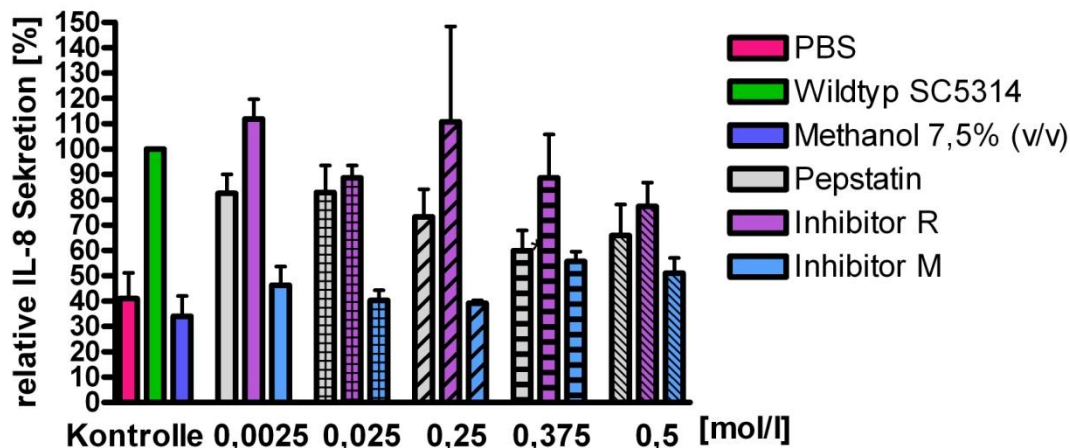
## Interleukin 8 (IL-8)

Bei der Fluconazol-Gruppe lässt sich bereits eine signifikant verminderte Interleukin 8 Freisetzung, im Vergleich zur Gruppe mit *Candida*-Zellen allein (WT), nach 24 Stunden für die Konzentrationen von  $0,127 \text{ mol/l} \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \text{ mol/l} \cdot 10^{-4}$  und  $2 \text{ mol/l} \cdot 10^{-4}$  nachweisen. Die beiden anderen eingesetzten Konzentrationen unterscheiden sich statistisch nicht von der Kontrollgruppe mit *Candida albicans* ohne Wirkstoffe (WT), (s. Abbildung 23).



**Abbildung 23:** relative Interleukin 8 Freisetzung nach 24 Stunden Inkubationszeit im Medium des Hautkonstrukts, links: Fluconazol, rechts: Pepstatin, A mit dazugehörigen Kontrollen: PBS = ohne *Candida*, WT = ohne Inhibitoren, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren; P-Werte: \* <0,05 – 0,01; \*\* 0,01 – 0,001; \*\*\* >0,001

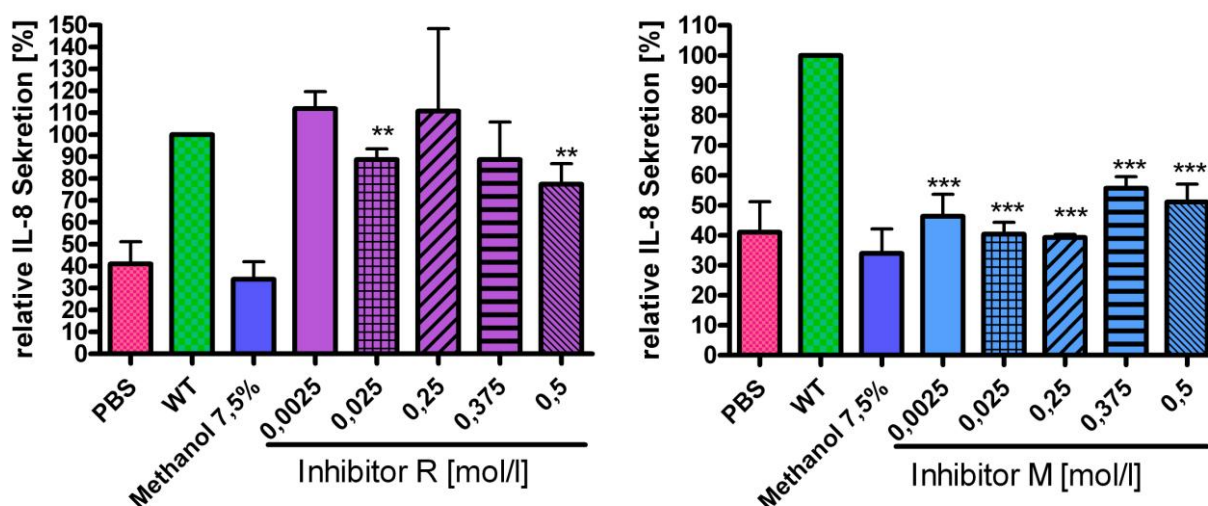
Pepstatin A zeigt für alle Konzentrationen eine geringere Sekretion im Vergleich zum Wildtyp, bis auf 0,025 mol/l Pepstatin A ist dies auch statistisch signifikant, wobei die geringste IL-8 Konzentration bei 0,375 mol/l gemessen werden konnte. Die Interleukin 8 Freisetzung nimmt von der mittleren Konzentration 0,25 mol/l schrittweise ab, was auf eine dosisabhängige Wirkung hinweisen könnte und steigt für 0,5 mol/l wieder etwas an.



**Abbildung 24:** Übersicht über relative Interleukin 8 Sekretion nach 24 Stunden Inkubationszeit für Sap-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen mit Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, WT = *Candida*-Zellen ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren

Die relative Sekretionsmenge von Inhibitor R sind vergleichsweise hoch (s. Abbildung 25), für die Konzentrationen 0,025 mol/l und 0,5 mol/l jedoch immer noch niedriger als die der Positivkontrolle mit *Candida* allein (WT). Ab einer Inhibitor-R-Konzentration von 0,25 mol/l nimmt die Interleukin 8 Freisetzung schrittweise ab, für 0,375 mol/l ist sie bereits geringer als die der Positivkontrolle mit *Candida* allein, jedoch zeigt sich diese Abnahme noch nicht statistisch signifikant. Dies war erst ab einer Inhibitor-Konzentration von 0,5 mol/l der Fall (s. Abbildung 25). Es zeigt sich, dass auch bei der Negativkontrolle mit PBS ohne Zusatz von *Candida*-Zellen oder Inhibitoren bereits eine IL-8 Freisetzung stattfindet, diese liegt bei etwa 40% der Wildtyp-Gruppe mit *Candida*-Zellen.

Inhibitor M zeigt eine vergleichsweise geringe Interleukin 8 Sekretion. Alle Werte sind signifikant geringer als die der WT-Kontrolle. Bereits bei 0,0025 mol/l ist die Freisetzung etwa 50% niedriger als bei *Candida* allein und nimmt weiter ab bis bei 0,25 mol/l ein Wert sogar unter dem der PBS-Gruppe ohne *Candida* erreicht ist, bei ca. 40% der Positivkontrolle (WT). Für die beiden höheren Konzentrationen von 0,375 mol/l und 0,5 mol/l steigt die Interleukin 8 Freisetzung erneut etwas an, ist jedoch immer noch signifikant geringer als die der Kontrollgruppe ohne Inhibitoren (s. Abbildung 25).



**Abbildung 25:** relative Interleukin 8 Freisetzung während 24 Stunden Inkubationszeit im Medium des Hautkonstrukts, links: Inhibitor R, rechts: Inhibitor M jeweils mit Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, WT = ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren; P-Werte: \* <0,05 – 0,01; \*\* 0,01 – 0,001; \*\*\* >0,001

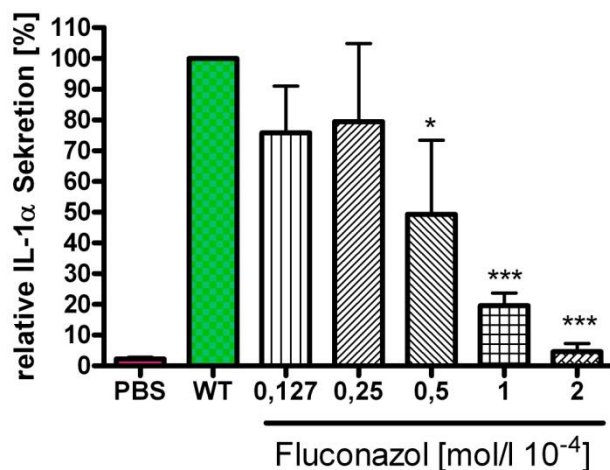
#### 4.3.2 Sezernierte Interleukin-Mengen nach 48 Stunden Inkubationszeit im Hautkonstrukt-gestützten Experiment

Interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ):

Die Interleukin-1 $\alpha$  Freisetzung nach 48 Stunden Inkubationszeit ist, wie bereits erwähnt, proportional zur Laktat-Dehydrogenase Aktivität. Mit steigender LDH-Freisetzung nimmt somit auch die Interleukin-1 $\alpha$  Sekretion zu, da beide unmittelbar durch den Zelltod der Epithelzellen freigesetzt werden. Für die beiden niedrigsten Fluconazol-Konzentrationen konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Kontrollwert mit *Candida* allein, gezeigt werden. Die drei höchsten Fluconazol-Konzentrationen wiesen jedoch eine dosisabhängige Abnahme der IL-1 $\alpha$  Konzentration auf, die auch statistisch signifikant ist. Es handelt sich dabei um die minimale Hemmkonzentration und die beiden höheren Fluconazol-Konzentrationen (s. Abbildung 26).

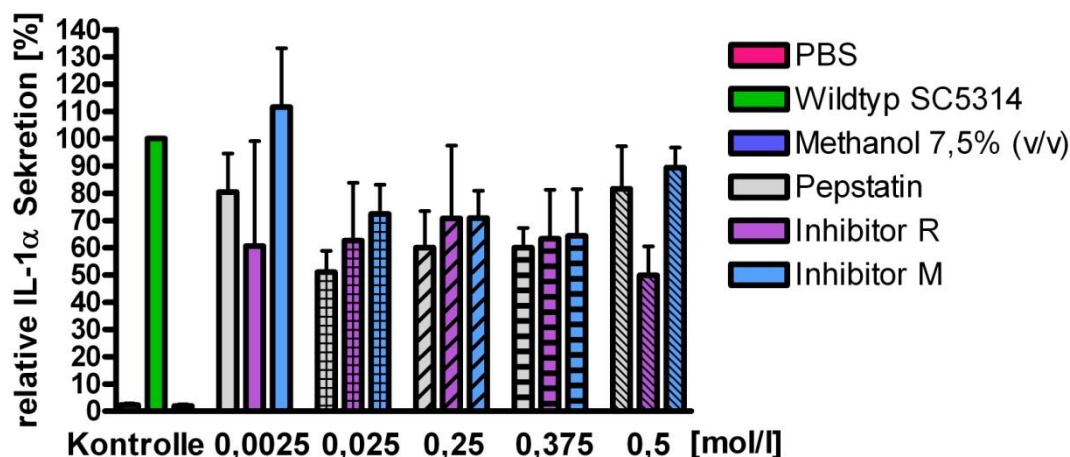
Pepstatin A wies für 0,025 mol/l, 0,25 mol/l und 0,375 mol/l eine statistisch signifikant geringere Menge an IL-1 $\alpha$  auf als die Kontrollgruppe ohne Inhibitoren. Die niedrigste und höchste Konzentration war im Gegensatz dazu nicht verschieden von der PBS-Gruppe (s. Abbildung 27). Gleiches gilt für Inhibitor M: es zeigte sich in den mittleren Inhibitor M-Konzentrationen eine Verminderung der IL-1 $\alpha$  Sekretion ins Medium, nicht aber für die höchste und niedrigste Konzentration.

Inhibitor R zeigte keine bedeutsamen Unterschiede im Vergleich zu Pepstatin A und war somit im gleichen Umfang in der Lage die Interleukin-Freisetzung zu stimulieren wie Pepstatin A. Inhibitor R wies in den Konzentrationen 0,025 mol/l, 0,375 mol/l und 0,5 mol/l eine signifikant geringere IL-1 $\alpha$  Konzentration auf als die Kontrollgruppe mit Wildtyp allein (s. Abbildung 27).



**Abbildung 26:** relative Interleukin-1 $\alpha$ - Konzentration nach 48 Stunden Inkubationszeit ins Medium des Hautkonstrukts für Fluconazol mit dazugehörigen Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, WT = *Candida* ohne Wirkstoffe, P-Werte: \* <0.05 – 0.01; \*\* 0.01 – 0.001; \*\*\* >0.001

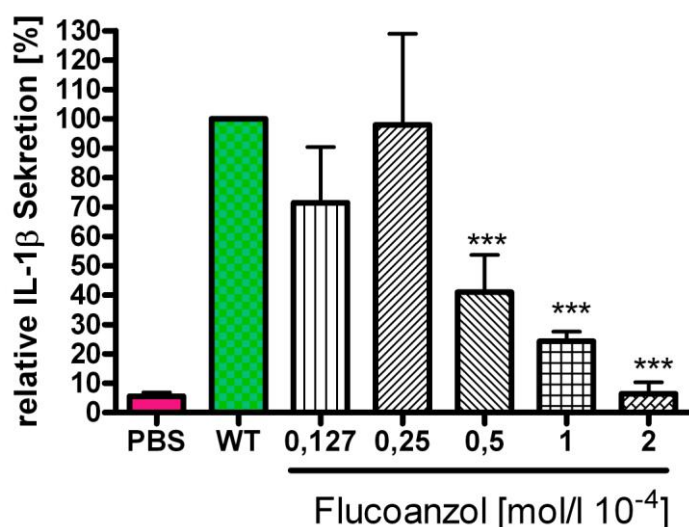




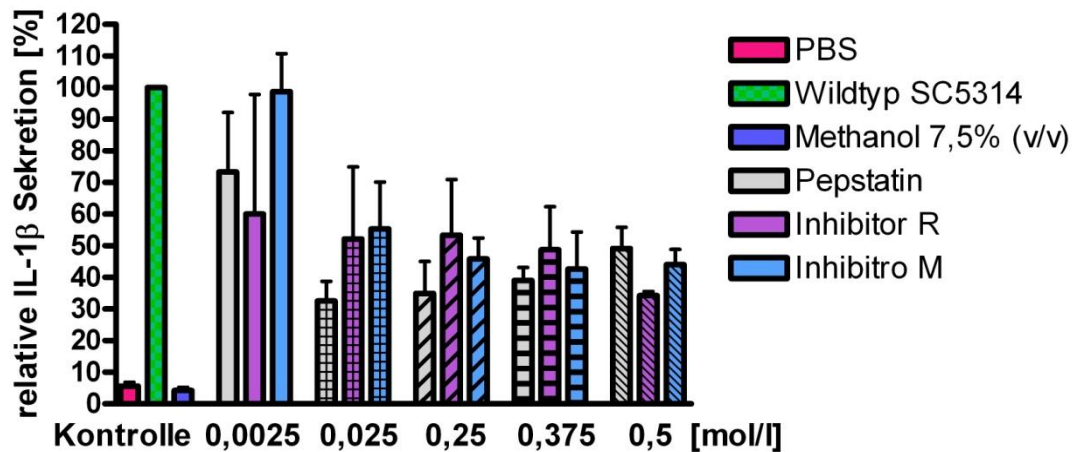
**Abbildung 27:** Übersicht über relative Interleukin-1 $\alpha$  Sekretion nach 48 Stunden Inkubationszeit für Sap-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen mit Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, WT = *Candida*-Zellen ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/L der Sap-Inhibitoren

#### Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ):

Die Fluconazol-Gruppe zeichnet sich wie auch bei den bereits vorangegangenen zytometrischen Bestimmungen durch eine geringere IL-1 $\beta$  Konzentration, ab der MHK, aus. Die beiden niedrigsten Fluconazol-Konzentrationen unterhalb dieser Konzentration zeigen dabei keine geringere Interleukin Freisetzung als die Kontrolle mit *Candida* allein. Die gemessene Menge IL-1 $\beta$  ist für 0,25mol/l  $\cdot 10^{-4}$  höher als die niedrigste Konzentration 0,127mol/l  $\cdot 10^{-4}$  (s. Abbildung 28).



**Abbildung 28:** relative IL-1 $\beta$  Freisetzung gemessen im Medium des Hautkonstrukts nach 48 Stunden Inkubationszeit unterschiedliche Fluconazol-Konzentrationen und Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, Wildtyp = ohne Wirkstoffe; \*\*\*P-Wert<0,001



**Abbildung 29:** Übersicht über die relative IL-1 $\beta$  Freisetzung der Sap-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen ins Medium des Haukonstrukts nach 48 Stunden Inkubationszeit und Kontrollen: PBS = ohne *Candida*, Wildtyp = ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren

Für die Sap-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Interleukin-1 $\beta$  Menge für die geringste eingesetzte Konzentration nicht signifikant niedriger ist als die des Wildtyps, jedoch für alle anderen Konzentrationen (s. Abbildung 29).

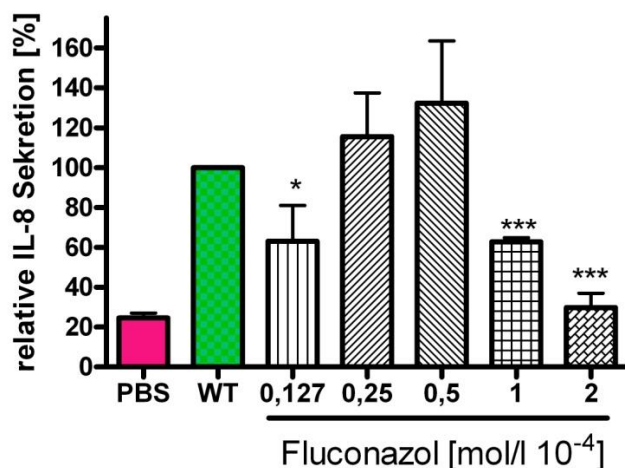
Pepstatin A zeigt zunächst eine starke Abnahme der IL-1 $\beta$  Konzentration, 0,025 mol/l stellt hier die niedrigste Menge an freiem Interleukin-1 $\beta$  dar. Mit steigender Pepstatin A-Konzentration erhöhen sich auch die gemessenen IL-1 $\beta$  Werte wieder, bleiben jedoch stets unter denen der Positivkontrolle mit *Candida* allein.

Inhibitor M weist in der niedrigsten Konzentration von 0,0025 mol/l noch die höchste gemessene IL-1 $\beta$  Menge auf mit knapp 100% des Wildtyps. Es kann eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen steigender Inhibitor-Konzentration und Abnahme der pro-inflammatorischen IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Wobei die Werte nach der großen Abnahme von der niedrigsten zur nächsthöheren Konzentration, nur minimal fallen.

Inhibitor R zeigt eine stetige, geringe Abnahme in der IL-1 $\beta$  Freisetzung. Die gemessene Konzentration an Interleukin-1 $\beta$  ist im Bereich von 0,025 mol/l, 0,25 mol/l und 0,375 mol/l etwa gleich hoch und nimmt bei der höchsten Konzentration von 0,5 mol/l nochmals deutlich ab im Vergleich zu 0,375 mol/l.

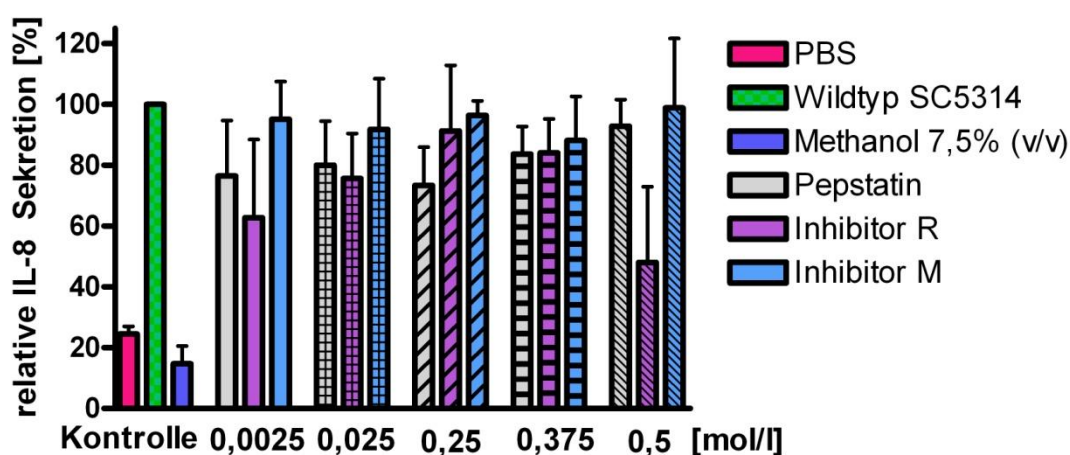
Interleukin 8 (IL-8):

Die Fluconazol-Gruppe zeigt in Bezug auf die IL-8 Sekretion nach 48 Stunden Inkubationszeit bis auf die Konzentrationen 0,25 mol/l  $\cdot 10^{-4}$  und 0,5 mol/l  $\cdot 10^{-4}$  einen signifikant geringeren Interleukin 8 Werte als die WT-Gruppe mit *Candida* allein. Vor allem die beiden höchsten Konzentrationen zeigen eine besonders niedrige IL-8 Sekretion.



**Abbildung 30:** relative Freisetzung von IL-8 nach 48 Stunden Inkubationszeit für verschiedene Fluconazol-Konzentrationen und dazugehörigen Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, WT = ohne Wirkstoffe; P-Werte: \* <0,05 – 0,01; \*\* 0,01 – 0,001; \*\*\* >0,001

Die gemessenen Interleukin 8 Werte für Pepstatin A und auch für Inhibitor M, zeigten sich als nicht signifikant geringer als die der WT-Kontrollgruppe, mit *Candida* allein. Die Freisetzung von IL-8 ist gerade für Inhibitor M in etwa bei allen eingesetzten Konzentrationen gleich groß. Pepstatin A zeigt zunächst eine niedrige Freisetzung für die Konzentrationen 0,0025 mol/l, 0,025 mol/l und 0,25 mol/l. Für die höheren Inhibitor-Konzentrationen nimmt die relative Sekretionsrate dann wieder zu (s. Abbildung 31). Inhibitor R zeigt zunächst eine niedrige IL-8 Sekretion, die mit steigender Konzentration schrittweise ansteigt und bei 0,25 mol/l ein Maximum aufweist. Für die beiden höchsten Inhibitor-Mengen 0,375 mol/l und 0,5 mol/l nimmt die Freisetzung dann wieder ab. Statistisch signifikant geringer als die Freisetzungsrates der Kontrollgruppe mit *Candida* allein, sind die Konzentrationen mit 0,025 mol/l und 0,5 mol/l des Inhibitor R.



**Abbildung 31:** Übersicht über die relative IL-8 Sekretion der Sap-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen ins Medium des Haukonstrukt nach 48 Stunden Inkubationszeit und Kontrollen: PBS = ohne *Candida*, Wildtyp = ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmengen in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren

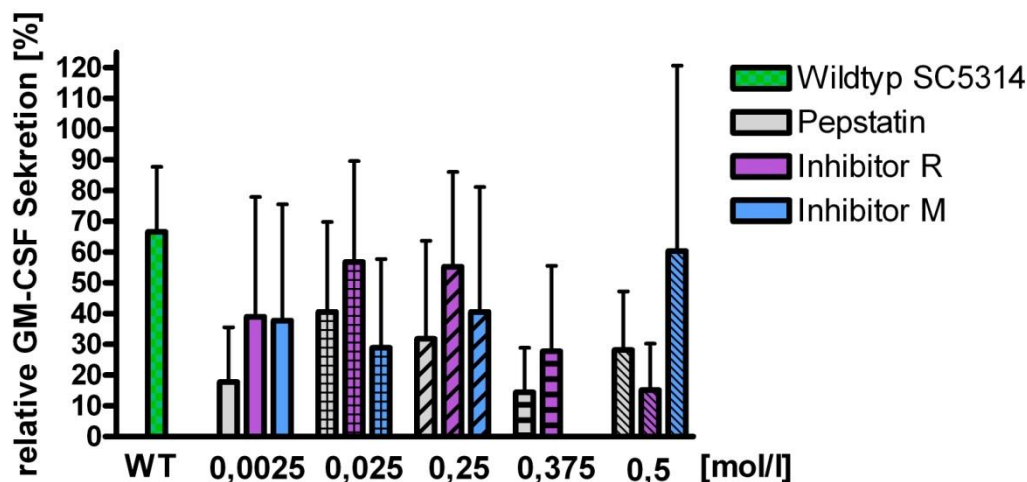


### 4.3.3 CBA Messung von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem-Faktor (GM-CSF) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

Auch der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF) sind durchflusszytometrisch bestimmt worden. Es waren dabei nur bei wenigen Messungen Werte oberhalb der Nachweisgrenze detektierbar (meist nur während einer Messung von drei bzw. sechs erfolgten Messungen), insofern konnte kein eindeutiges Ergebnis ermittelt werden. Dies zeigt sich auch in den hohen Mittelwertsabweichungen.

GM-CSF konnte nach 24 Stunden nur für den Wildtyp nachgewiesen werden. Dies geschah insbesondere dann, wenn die Proben gleichfalls sehr hohe LDH-Werte zeigten, was auf einen großen Gewebeschaden hindeuten könnte.

Nach 48 Stunden konnte eine GM-CSF Sekretion bei mehreren Konzentrationen nachgewiesen werden (s. Abbildung 32). Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten verzichtet, da dies nicht zu einem eindeutigen Ergebnis geführt hätte.



**Abbildung 32:** GM-CSF Freisetzung nach 48 Stunden gemessen im Medium des Hautkonstrukts für unterschiedliche Konzentrationen Sap-Inhibitoren und dazugehörigen Kontrollen, PBS = ohne *Candida*, Wildtyp = ohne Wirkstoffe, Methanol 7,5% = ohne *Candida* korrespondiert mit Lösungsmittelmenge in 0,5 mol/l der Sap-Inhibitoren

TNF konnte bei den meisten Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden war auch bei diesem Versuch allein für den Wildtyp die Nachweisgrenze bei einer Messung überschritten.

Während der weiteren Inkubationszeit konnte zwar für einige wenige Wirkstoff-Konzentrationen die Nachweisgrenze überschritten werden. Jedoch war dies eine Aus-

nahme, was sich in der Häufigkeit von einer, maximal zwei Messungen des Zytokins zeigt. Von einer statistischen Auswertung wurde daher abgesehen.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Adhärenz Assay eine inhibierende Wirkung der Sap-Inhibitoren in Bezug auf die Anlagerung von *Candida albicans* an epitheliale Zellen, in den beiden höchsten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch für das Antimykotikum Fluconazol. Die neuen entwickelten Inhibitoren sind in dieser Wirkung, die Adhärenz von *Candida*-Zellen an epitheliale Monolayer zu verhindern, Pepstatin A überlegen. Am Potentesten zeigte sich dabei Inhibitor R.

Ein Einfluss des Lösungsmittels Methanol in den eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen konnte nicht nachgewiesen werden. Lediglich für eine Gruppe, Pepstatin A in einer Konzentration von 0,5 mol/l, konnte kein statistischer Unterschied zwischen der verwendeten Methanol-Konzentration und der Gruppe mit Pepstatin A gefunden werden.

Im Hautkonstrukt gestütztem Experiment konnte für Fluconazol nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit eine *Candida*-inhibierende, dosisabhängige Wirkung nachgewiesen werden, obwohl sich im Adhärenz Assay kein Einfluss auf die Anlagerung der Hefezellen zeigte. Nachweisbar ist dies sowohl in histologischen Befunden, als auch aufgrund von erniedrigten Werten für die LDH-Aktivität, Interleukin-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , sowie für Interleukin 8.

Die Sap-Inhibitoren (Pepstatin A, Inhibitor M und R) waren ebenfalls in der Lage, das Schadensausmaß zu begrenzen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die LDH-Aktivität gelegt, da erhöhte Werte unmittelbar mit einer Epithelschädigung in Verbindung zu bringen sind. Ergänzt werden die LDH-Werte durch die Messung der Zytokin-Sekretion (vor allem der Interleukine), die als Marker der Immunantwort angesehen werden. Eine verringerte Interleukin-Sekretion, ist somit ein Indiz für eine schwächere Immunantwort des Wirtes und geht mit einer wahrscheinlich verminderten Gewebeschädigung einher.

Insbesondere Inhibitor M zeigte nach 24 Stunden Inkubationszeit eine dosisabhängige, *Candida*-inhibierende Wirkung. Eine Endkonzentration bei der ein *steady state* gezeigt werden konnte, wurde nicht gefunden. Höhere Inhibitorkonzentrationen könnten daher das Ausmaß an Gewebeschäden voraussichtlich noch weiter verringern. Die LDH-Aktivität ist dabei proportional zur gefundenen Interleukin 1 $\alpha$ -Menge.

Die Wirkung von Inhibitor R ist ab der mittleren Konzentration mit der von Pepstatin A vergleichbar, wobei niedrigere Konzentrationen nicht in der Lage waren das Schadensbild wesentlich günstig zu beeinflussen. Insgesamt wirken sich beide neuen Inhibitoren günstiger auf das Schadensbild der Kandidose aus, als Pepstatin A. Inhibitor M ist von den drei getesteten Sap-Inhibitoren aufgrund der gefundenen Ergebnisse der Potentes-  
te.

Eine signifikante Restwirkung nach 48 Stunden Inkubationszeit konnte für die Sap-Inhibitoren nur vereinzelt nachgewiesen werden. Möglicherweise greifen andere Mechanismen ein, die die Sap-Hemmung dann wieder ausgleichen.

GM-CSF und TNF sind ebenfalls bekannte pro-inflammatorische Zytokine, die mit dem Auftreten einer *Candida*-Infektion korrelieren. Es konnten jedoch nur vereinzelt Werte gemessen werden, die stets mit besonders hohen Gewebeschäden verbunden waren. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl an Messergebnissen nicht vorgenommen. Es bleibt jedoch festzustellen, dass das verwendete Hautmodell generell in der Lage ist dieses Zytokin zu bilden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Candida-Keratinozyten-Adhärenz Assay

In früheren Adhärenz-Studien konnte gezeigt werden das *Candida albicans* nicht nur der virulenteste, sondern gleichzeitig auch der adhärenteste Vertreter seines Stammes ist [74]. Die Anlagerung von *Candida*-Zellen an Haut und Schleimhaut ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, unter anderem vom Stamm, dem Wachstumsstadium, -form und -medium der Hefezellen [119], aber beispielsweise auch von der Morphologie und Herkunft des Gewebes, an dem die Hefen adhäreren können [22].

Es konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die Anzahl der adhären-ten *Candida*-Zellen durch die Zugabe von Pepstatin A, dosisabhängig reduziert werden konnte [22, 74, 119]. Dies war auch bei dem hier eingesetzten Adhärenz Assay der Fall.

Da Pepstatin A in der Lage ist, die sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap) zu hemmen, wurde ein Zusammenhang mit der verringerten Adhärenz, nachfolgender Invasion und damit verbundener Schädigung des Wirtsorganismus postuliert und bereits in anderen Publikationen beschrieben [22, 74, 87, 93, 95, 99, 102, 119].

So zeigten genetisch veränderte Mutanten des Wildtypes SC5314, die nicht mehr in der Lage waren bestimmte Sap-Gene bzw. -Enzyme zu produzieren, eine verminderte Virulenz in verschiedenen Versuchsmodellen [22, 32, 54, 93, 99, 119]. Gleichzeitig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die sekretorischen Aspartatproteinasen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht allein oder nur indirekt für die Adhärenz der *Candida*-Zellen verantwortlich sind [22, 70].

Lermann und Morschhäuser konnten in ihren Versuchen gar keine Beteiligung von SAP-Genen an der Adhärenz und nachfolgender Invasion von *Candida albicans* feststellen [57]. Die in den Experimenten der Gruppe verwendeten SAP-definierter Mutanten, führten zu keinem nachweisbaren geringeren Schaden als der eingesetzte Wildtyp.

Das Schadensbild ist abhängig vom verwendeten Infektionsmodell, so konnten Naglik *et al.* 2008 zeigen, dass die Vorinkubation der *Candida*-Zellen mit den Sap-Inhibitoren eine entscheidende Rolle spielt, um eine Verringerung des Schadens nachweisen zu können [22, 70]. Diese Erkenntnis wurde in den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit berücksichtigt, nicht jedoch von Lermann und Morschhäuser. Dass die Sap-Inhibierung durchaus einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der Kandidose hat, zeigt

sich dadurch, dass die eingesetzten Sap-Inhibitoren, vor allem Inhibitor M, sowohl im Adhärenz Assay als auch im Hautkonstrukt gestützten Experimenten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigten. So war beispielsweise Inhibitor M in der Lage, die Adhärenz von Hefezellen an den epithelialen Monolayer signifikant zu verringern und zeigte ebenfalls in den gleichen Konzentrationen einen verringerten Epithelschaden am Hautmodell, der immunologisch durch geringere LDH- und Interleukin-Werte nachgewiesen werden konnte und gleichzeitig auch mikroskopisch nachweisbar war.

Es ist derzeit unbekannt in welchem Umfang die Sap-Isoenzyme durch Pepstatin A gehemmt werden, und ob es dabei Unterschiede im Ausmaß der Hemmung zwischen den einzelnen Isoenzymen gibt [119]. Ferner besteht auch die Möglichkeit, dass andere Mechanismen, z. B. Virulenzfaktoren wie phänotypisches *switching*, aufgrund der Sap-Hemmung zum Einsatz kommen, die ohne die Enzymhemmung nicht oder nicht in dem Ausmaß zum Tragen gekommen wären und damit u. a. die Adhärenz beeinflussen können. Ein Hinweis darauf könnten, die Zunahme der immunologischen Werte (LDH-Aktivität und Interleukin-Sekretion) nach 48 Stunden Inkubationszeit im Hautmodell sein.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde neben dem Einfluss von Pepstatin A auf die Adhärenz ebenfalls der von Fluconazol, sowie der von Pepstatin A abgeleiteten neusynthetisierten Inhibitoren M und R untersucht.

Mit Hilfe des Adhärenz-Assays konnte gezeigt werden, dass Pepstatin A und auch die neuen Sap-Inhibitoren die Anzahl anhaftender Candida-Zellen an dem verwendeten Keratinozyten-Monolayer in einer Konzentration von 0,5 mol/l und 1 mol/l verringern konnten. Die neuen Inhibitoren waren dabei Pepstatin A überlegen.

Für Fluconazol konnte in keiner eingesetzten Konzentration eine Abnahme adhärenter Candida-Zellen gezeigt werden. Es ist nicht bekannt, dass Fluconazol die Sekretion von Sap beeinflusst oder zu einer Enzymhemmung führt. Als Azolderivat greift es in die Zellwandsynthese ein, sodass der fungizide Effekt in diesem Experiment möglicherweise nicht zum Tragen kommen konnte, da die Dauer des Experimentes mit 90 Minuten inklusive Vorinkubation hierfür gegeben falls zu kurz waren.

Ollert *et al.* beschrieb in seiner Arbeit, dass bereits eine Konzentration von 0,001 mol/l Pepstatin A ausreichend war um die Anzahl von adhärenen Candida-Zellen auf 55% der Positivkontrolle zu senken, die neben den Hefezellen nur PBS enthielt. Obwohl die Adhärenz für 0,01 mol/l und 0,1 mol/l etwas zunahm, so waren die Werte immer noch signifikant unter dem Ausgangswert der Wildtyp-Kontrolle. In der hier vorliegenden Arbeit

konnte dies erst in höheren Konzentrationen von 0,5 mol/l bzw. 1 mol/l und gleichzeitig mit geringerem Ausmaß nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im Gegensatz zur Arbeit von Ollert *et al.* gehen vermutlich auf die Verwendung anderer Epithelzellen zurück. In seiner Arbeit wurden neonatale Zellen aus Vorhautgewebe verwendet, die in einem vorhergehenden Schritt selbst gewonnen wurden, wobei in den hier beschriebenen Experimenten standardisierte Zellen der Firma Cascade Biologics verwendet wurden [22, 74].

Überdies verwendeten Ollert *et al.* Dimethylsulfoxid (DMSO) im Gegensatz zu Methanol als Lösungsmittel für Pepstatin A, auch das könnte sich auf die Ergebnisse ausgewirkt haben. Aufgrund des Einflusses des hier verwendeten Methanols auf die Anlagerung der Hefezellen, wäre der Einsatz eines Lösungsvermittlers und damit eine Reduktion der einzusetzenden Menge Methanol oder eines anderen Lösungsmittels zu erwägen. DMSO eignet sich dabei eher nicht, da es nicht zur systemischen Anwendung am Menschen geeignet ist. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist somit nicht ohne weiteres gewährleistet. Eine Überlegung wäre der Einsatz von Sojalecithin als Lösungsvermittler, das auch bei der parenteralen Ernährung mit Hilfe von Emulsionen zum Einsatz kommt.

## **5.2 Quantitative und qualitative Charakterisierung des Schadens durch *Candida albicans* am oralen Hautkonstrukt mittels LDH-Aktivität**

Der Einsatz von künstlichen Hautkonstrukten dient unter anderem der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Keim und Wirt, mit dem Ziel diese Mechanismen auf molekularer Ebene zu entschlüsseln um dadurch eine Verbesserung oder Entwicklung der gezielten Therapie herbeizuführen (*bench-to-bedside*-Prinzip) [105].

Ursprünglich wurden Tiermodelle eingesetzt um die Pathogenese der Kandidosen zu untersuchen. Die Verwendung tierischer Modelle, wird wegen ethischen Bedenken jedoch mittlerweile nicht mehr favorisiert. Ein Kritikpunkt stellt die mangelnde Übertragbarkeit der im Tierversuch gewonnen Ergebnisse auf den Menschen dar. So ist *Candida albicans* beispielsweise anders als beim Menschen, kein natürlich vorkommender Bestandteil der Hautflora ist. Eine Infektion mit dem Hefepilz ist daher, bei den häufig eingesetzten Nagern, oft nur mit einer Immunsuppression möglich. Dies wiederum ent-

spricht nicht dem physiologischen Zustand beim Menschen zum Zeitpunkt einer Infektion. So tritt beispielsweise die vaginalen Kandidosen auch bei immunkompetenten Patienten häufig auf [105, 108].

Der Schaden, der durch *Candida albicans* während des Hautkonstrukt-gestützten Experimentes entstanden ist, wurde u. a. mit Hilfe der LDH-Aktivität quantitativ und qualitativ erfasst.

Um die Versuchsparameter zu überprüfen und eine gleichzeitige Vergleichsmöglichkeit über die Aussagekraft der Ergebnisse zu schaffen, wurde Fluconazol als Vergleichssubstanz eingesetzt. Das breit eingesetzte Antimykotikum war in der Lage eine dosisabhängige Reduktion der LDH-Aktivität und eine Verringerung des Schadens herbeizuführen. Die verwendeten Fluconazol-Konzentrationen lagen dabei bei der klinischen, bekannten minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Wildtyps SC5314 (64 ng/mL), sowie jeweils zwei Verdünnungsstufen darunter und darüber. In der Literatur werden verschiedene MHKs beschrieben, je nach verwendetem *Candida*-Stamm liegen die Werte zwischen 1 bis 64 µg/mL [4, 89, 122].

Pepstatin A, als häufig verwendeter Vertreter der Sap-Inhibitoren im Bereich der klinischen Forschung und sogenannter Goldstandard konnte (wie bereits Fluconazol) eine Abnahme des Schadensausmaßes zeigen. In der Literatur wurden häufig 10 µmol, 15 µmol bzw. 20 µmol Pepstatin A eingesetzt (entsprechend Konzentrationen von 0,25 mol/l; 0,375 mol/l und 0,5 mol/l, in der hier vorliegenden Arbeit), wobei bereits 1 µmol Pepstatin A zu einer verringerten Schädigung des Epithels geführt haben [70, 90, 93, 103].

In den hier beschriebenen Versuchen konnte bereits für die Konzentration von 0,0025 mol/l und ebenfalls für die Konzentrationen 0,25 mol/l sowie 0,375 mol/l Pepstatin A, eine statistisch signifikante Abnahme der LDH-Aktivität und dem damit einhergehenden Schaden nach 24 Stunden nachgewiesen werden.

Die beiden chemisch abgeleiteten Inhibitoren zeigten wie erwartet, ebenso wie Pepstatin A, eine dosisabhängige Verminderung des Schadenbildes und gleichzeitig der LDH-Aktivität. Inhibitor M wies, im Gegensatz zu Pepstatin A, in allen getesteten Konzentrationen eine signifikante Abnahme der LDH-Aktivität auf. Bei einer Konzentration 0,025 mol/l lagen die Werte von Inhibitor M gleichauf mit denen von Pepstatin A, in allen folgenden höheren Konzentrationen sogar darunter. Bei einer Konzentration von 0,5 mol/l Inhibitor M betrug die LDH-Aktivität nur noch etwa 40% der Positivkontrolle mit *Candida* allein ohne Sap-Inhibitoren, im Gegensatz zu Pepstatin A mit ca. 75%. Ein

*steady-state* hatte sich dabei noch nicht eingestellt. Es bleibt für zukünftige Versuche zu klären in wie weit höhere Inhibitor M-Konzentrationen zu einer weiteren Verringerung des Schadens und der damit korrelierenden LDH-Aktivität führen oder ob es zu einem *ceiling-up*-Effekt kommt, bei dem eine weitere Dosiserhöhung nicht mit einem vermehrten Arzneistoff-Wirkung einhergeht. Dies deutet sich für Inhibitor R an, bei dem die LDH-Aktivität für 0,25 mol/l stark abnimmt, jedoch erst für 0,375 mol/l und 0,5 mol/l signifikant geringer ist und etwa gleich hoch ist, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit *Candida* allein. Inhibitor R vermag nicht im gleichen Maße den Schaden des Hautkonstrukts zu hemmen, wie Inhibitor M. Es sind dafür höhere Konzentrationen als für Inhibitor M, von mindestens 0,25 mol/l erforderlich, um eine statistisch signifikante Erniedrigung der LDH-Aktivität herbeizuführen (ca. 75% im Vergleich zur WT-Gruppe mit *Candida* allein, ohne Inhibitoren). Es besteht damit die Möglichkeit, dass Inhibitor M auch in weitere Stoffwechselprozesse eingreift.

Nach 48 Stunden ist die Wirkung aller eingesetzten Sap-Inhibitoren deutlich schwächer. Dies könnte für den Verbrauch der Substanzen oder deren Abbau sprechen. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass andere Faktoren (z. B. Stoffwechselprodukte oder Virulenzfaktoren) hochreguliert werden, die die Effekte der Sap-Hemmung ausgleichen und somit die Ausmaße des Schadens wieder größer werden. Weiterhin fand nach 24 Stunden ein Mediumwechsel statt. Alle bis dahin produzierten Abwehrstoffe der Keratinozyten, die eine protektive Wirkung haben könnten, werden damit entfernt.

### **5.3 Charakterisierung des Schadensausmaß am Hautkonstrukt aufgrund der Wirtsantwort durch Messung der Zytokin-Freisetzung mittels CBA**

Neben den bereits erwähnten Experimenten zur Quantifizierung des Schadens am Hautmodell, wurde auch die Immunantwort des Epithels anhand der Menge proinflammatorischer Zytokine im Medium mit Hilfe des CBA-Assays gemessen. Zytokine dienen zum einen dazu, Immunzellen zu aktivieren und zum Infektionsort zu locken, sie unterstützen jedoch auch die Singalübertragung und können auch selbst die Keime beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass polymorphkernige Leukozyten (PMN) auch ohne direkten Kontakt mit den *Candida*-Zellen in der Lage sind Zellschäden durch die Keime zu verhindern, was dafür spricht, dass die PMS's Substanzen abgeben, die diese



Vorgänge beeinflussen [101, 105]. Durch Zytokine werden vor allem die PMS zum Infektionsort gelockt um dort die Wirtsantwort auszuführen, weitere Immunzellen anlocken und zum typischen Erscheinungsbild von Mikroabzessen während einer Candida-Infektion führen können, um somit das umliegende Gewebe vor dem Erreger selbst schützen [31].

*Candida albicans* führt nachweislich zu einer erhöhten Freisetzung der gemessenen pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  und GM-CSF [97, 105]. Endotheliale Zellen sind in der Lage diese Zytokine zu produzieren, ohne dass dafür weitere Immunzellen erforderlich sind [98, 118].

Das Zytokin-Muster ist dabei abhängig von der eingesetzten *Candida*-Spezies. So führt *Candida albicans* als virulentester Vertreter mit dem höchsten verursachten Gewebeschaden auch zur stärksten Zunahme der genannten Entzündungsmediatoren, während die Immunantwort bei *C. tropicalis* abgeschwächt ist und bei *C. glabrata* nicht mehr nachweisbar ist, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene [97].

Dass die Freisetzung der sekretorischen Aspartatproteinasen für die Zytokin-Sezernierung der Epithelzellen verantwortlich sein könnte, zeigt sich daran, dass hitze-inaktivierte Candida-Zellen nicht in der Lage sind eine Wirtsantwort zu provozieren. Es sind folglich Stoffe für die Wirtsantwort verantwortlich, die von lebenden Candida-Zellen produziert und freigesetzt werden, im Gegensatz zu Bakterien bei denen bereits Zellwandbestandteile für die Stimulation der Wirtsantwort ausreichen.

Dies könnte auch erklären, warum es so viele gesunde Träger gibt, die den Pilz beherbergen, ohne an einer Kandidose zu erkranken. Das alleinige Vorhandensein der Hefen ist nicht zwingend für eine Infektion allein nötig, sondern die Candida-Zellen müssen die provozierenden Substanzen auch freisetzen. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Produkte nur unter bestimmten Voraussetzungen, wie beispielsweise einer Immunschwäche des Patienten, von Candida-Zellen produziert werden [97, 105]. Und somit eine Hemmung von Sap, wie durch die hier getesteten Sap-Inhibitoren, während einer Kandidose entsprechend positiven Einfluss auf die Pathogenese nehmen könnten.

### 5.3.1 Interleukin 1 $\alpha$

IL-1 $\alpha$  ist bei Patienten mit Kandidose, jedoch nicht bei Gesunden nachweisbar und eines der vorrangigen Entzündungsmediatoren der Candida-Infektion. Nachweisbar ist dies durch einen Anstieg der mRNA-Level, aber auch der fertigen Proteine [27, 97].

Für die Inhibitoren M und R konnte unter dem Gesichtspunkt der IL-1 $\alpha$ -Sekretion zunächst eine dosisabhängige Abnahme der Zytokinmenge nach 24 Stunden Inkubationszeit gezeigt werden, die jedoch in beiden Fällen ab 0,375 mol/l wieder anstiegen und bei 0,5 mol/l nicht mehr signifikant unter den Werten der Wildtyp-Kontrolle mit *Candida* allein lagen. Für Pepstatin A zeigte sich dasselbe Muster wie bei der LDH-Aktivität und damit nur für die Konzentrationen von 0,025 mol/l, 0,25 mol/l und 0,5 mol/l ein signifikanter Rückgang. Dass die Zytokinmenge ausgerechnet bei den Inhibitor-Konzentrationen ansteigt, bei denen aufgrund der LDH-Aktivität der geringste Schaden entstanden ist, lässt vermuten, dass es um eine aktive Freisetzung der Zytokine aus der Proform über Calpain bzw. membrangebundene Vorstufen handelt.

Für eine passive Freisetzung wären Gewebeschäden nötig, die sich bei diesen Konzentrationen mit LDH nicht nachweisen ließen. Theoretisch könnten die Sap als mögliche Enzyme der Aktivierung der Vorstufen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Frage kommen, da diese jedoch durch die Inhibitoren gehemmt sind, können de facto jedoch nur andere Proteasen oder Proteinasen aus dem Epithel dafür in Frage kommen [5, 24, 55]. Die Vorstufen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  weisen bereits eine gewisse Aktivität auf. Es ist somit auch möglich, dass bereits diese Aktivität ausreichend ist um den Schaden durch *C. albicans* signifikant in diesen Konzentrationen zu verringern [24] ohne dass die aktive Form freigesetzt wird.

In der Literatur finden sich jedoch Hinweise darauf, dass uninfizierte Epithelzellen vor allem die Vorstufen von IL-1 $\alpha$  freisetzen. Im Gegensatz dazu zeigen Epithelzellen, die mit *C. albicans* in Kontakt kamen, überwiegend die Freisetzung der aktiven Form. Das spricht zusätzlich für einen aktiven Freisetzungs-Mechanismus.

In weiteren Versuchen konnten nach Hemmung von Proteasen im Medium beide Proteine, die aktive Form und das Proprotein nachgewiesen werden, nachdem die Epithelzellen durch die Infektion zerstört wurden [27]. Es besteht eine Korrelation zwischen LDH-Aktivität und IL-1 $\alpha$  die auch in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte [27]. Ferner scheint IL-1 $\alpha$  noch eher der LDH-Aktivität proportional zu sein, als IL-1 $\beta$ . Auch dieses Phänomen ist bereits bekannt [24].

### 5.3.2 Interleukin 1 $\beta$

Schaller *et al.* konnten 2005 zeigen, dass eine Konzentration von 15  $\mu$ M Pepstatin (entspricht einer Konzentration von 0,375 mol/l in dieser Arbeit) in der Lage war die Frei-

setzung von IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF nach 12 bzw. 24 Stunden signifikant zu senken, gleichermaßen auf mRNA- als auch Proteinebene [103].

In Hinsicht auf IL-1 $\beta$  konnte in der Pepstatin A-Gruppe der hier vorliegenden Arbeit, erst für 0,5 mol/l (entsprechend 20  $\mu$ mol) eine signifikante Abnahme gezeigt werden.

Die zu charakterisierenden Sap-Inhibitoren zeigten zunächst eine Abnahme der Zytokinmenge, die im Bereich von 0,025 mol/l bis 0,375 mol/l etwa auf gleicher Höhe lag und schließlich für 0,5 mol/l wieder anstieg. Das Zytokin wird zwar von Keratinozyten produziert, jedoch nur in einer inaktiven Form [64]. Unter normalen Umständen ist eine von Monozyten produzierte Cysteinprotease nötig um das Vorläuferprotein zu spalten und so die aktive Form freizusetzen, jedoch können auch andere Enzyme zur Spaltung führen, wie beispielsweise Sap [55, 64]. Im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  soll von IL-1 $\beta$  keine membran-gebundene Form existieren, sondern nur eine zytosolische Speicherform, die mit dem Golgi-Apparat assoziiert ist [24]. Nachweislich führen Sap1, Sap2 und Sap6 zu einem starken Anstieg der IL-1 $\beta$ -Freisetzung, die auch Pepstatin A nicht zu hemmen vermag. Pitrella *et al.* schlussfolgert daraus, dass die proteolytischen Fähigkeiten der Sap nicht erforderlich sind, um IL-1 $\beta$  aus der Speicherform freizusetzen und somit auch das pH-Optimum dieser Enzyme keine Rolle spielt [76]. Dies würde erklären, warum für alle Sap-Inhibitoren die IL-1 $\beta$  Werte etwa auf der gleichen Höhe liegen und auch unter den verschiedenen Konzentrationen vergleichsweise wenig variieren. In dem Fall würden die Sap-Inhibitoren die IL-1 $\beta$ -Freisetzung nicht beeinflussen, sondern wären von anderen Faktoren abhängig.

Die erhöhten Werte der IL-1 $\beta$ -Sekretion bei 0,0025 mol/l, die mit dem höchsten Schaden bei den neuen Inhibitoren einhergehen, lassen sich eventuell dadurch erklären, dass die meiste gebildete mRNA nicht in die Proteinform umgeschrieben, sondern abgebaut wird, bevor sie aktiviert und schließlich translatiert werden kann [24]. Es konnte nachgewiesen werden, dass mikrobielle Stoffwechselprodukte die mRNA stabilisieren können und so den Abbau verhindern. Damit steigt auch die Menge an produziertem IL-1 $\beta$ -Protein, da mehr mRNA zur Verfügung steht [24]. Indem die Stoffwechselprozesse der Hefepilze bei einer sehr niedrigen Inhibitorkonzentration weniger beeinflusst werden, sind diese stabilisierenden Produkte eventuell in größerem Umfang vorhanden als bei stärker Sap-gehemmten Pilzzellen.

### 5.3.3 Interleukin 8

*Candida albicans* ist in der Lage die Sekretion von IL-8 zu provozieren, wenn epitheliale Zellen mit dem Hefezellen in Kontakt kommen. Die Freisetzung von IL-8 kann dann durch IL-1 $\alpha$  gefördert werden, so konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten durch Stimulation durch IL-1 vermehrt IL-8 produzieren [7, 27]. Diese Stimulation erklärt eventuell den starken Anstieg von IL-8 nach 48 Stunden in den vorangestellten Versuchen, im Gegensatz zu den anderen Interleukinen für die die gemessenen Mengen nicht so stark anstiegen. Es könnte jedoch auch mit dem biphasischen Verlauf der mRNA-Erhöhung zusammenhängen. Demnach nimmt die mRNA-Konzentration zunächst zu, wobei das erste Maximum nach ca. 4 Stunden gemessen wurde, um dann zunächst abzufallen und erst nach einiger Zeit (zwischen 8 und 24 Stunden) wieder zuzunehmen. Erklärt wird dieses Phänomen damit, dass zunächst die gebildete mRNA in das Protein umgeschrieben werden muss bevor neue gebildet werden kann und es somit einer zweiten Aktivierung, z. B. durch ein Zytokin bedarf um erneut mRNA zu bilden [7, 65].

In der Literatur konnte nach 24 Stunden eine IL-8-Zunahme des Proteins im Medium von Hautmodellen nachgewiesen werden, wenn diese zuvor mit *Candida* infiziert wurden [25, 27].

So konnte in den hier zugrundeliegenden Versuchen für Pepstatin A eine Abnahme des aktiven Zytokins im Medium des Hautkonstrukts in den Konzentrationen von 0,25 mol/l, 0,375 mol/l und 0,5 mol/l nach 24 Stunden festgestellt werden. Inhibitor R zeigte für 0,025 mol/l und 0,5 mol/l signifikant verringerte Werte. Inhibitor M zeigt einen wesentlich stärkeren Rückgang der IL-8-Sekretion auf niedrigem Level. Allerdings stiegen die gemessenen Konzentrationen für 0,375 mol/l und 0,5 mol/l wieder an, was für eine ebenfalls aktive Freisetzung wie bei IL-1 $\alpha$  spricht, da die LDH-Werte bei diesen Konzentrationen besonders niedrig waren.

### 5.3.4 Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor und Tumor-Nekrose-Faktor

GM-CSF erhöht als pro-inflammatorisches Zytokin den intrazellulären oxidativen Metabolismus und damit die phagozytierenden Eigenschaften bestimmter Immunzellen, wodurch der durch *Candida albicans* vermittelte Schaden abnimmt [4]. Außerdem fördert es die Proliferation von Immunzellen, steigert die Endozytose, die Aktivität antigen-präsentierender Zellen sowie den Metabolismus reifer Zellen einschließlich der Synthe-

se antimikrobieller Stoffe und der Freisetzung weiterer Zytokine [4, 26, 28, 97]. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit invasiver, systemischer Kandidose nach Gabe von GM-CSF die Überlebensrate gesteigert werden konnte und es wurde sogar der Einsatz in der antimikrobiellen Therapie solcher Patienten erwogen [4, 27, 45].

Wider Erwarten konnte in den hier verwendeten Modellen nur bei wenigen Messungen überhaupt eine GM-CSF-Freisetzung nachgewiesen werden. Dies kann zum einem an dem verwendeten Hautkonstrukt oder der angewendeten Methode liegen. Eventuell ist auch der Beobachtungszeitraum von maximal 48 Stunden zu kurz um eine garantierte Freisetzung zu erreichen. Da jedoch einige Versuche während der Experimentenreihe eine GM-CSF-Sekretion gezeigt haben, besteht auch die Möglichkeit, dass ein bestimmter Faktor ausschlaggebend für die Freisetzung ist, z. B. ein bestimmtes Zytokin-Muster, das zur Aktivierung der Freisetzung erforderlich ist. So waren GM-CSF Konzentrationen über der Nachweisgrenze immer dann erreicht, wenn ein besonders hoher Gewebeschaden ebenfalls nachweisbar war.

TNF- $\alpha$  wird ebenfalls im Zuge der Candida-Infektion freigesetzt, wobei die Menge bei anderen Gruppen nach 24 Stunden und 48 Stunde in etwa gleich hoch ist und bei Messungen mittels ELISA etwa bei 10 pg/mL liegt [65]. Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  führt zu einer zwei- bis dreimal höheren IL-8 Sekretion [114]. Auch wenn nur wenige Ergebnisse zur Verfügung standen, so lagen die ermittelten Ergebnisse innerhalb dieses beschriebenen Bereichs. Jedoch konnten sehr hohe IL-8 Freisetzungen nicht immer zu einer TNF- $\alpha$ -Freisetzung führen. In einem Versuch mit Monozyten konnte Pietrella 2010 keine Abnahme der TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Pepstatin A feststellen und postulierte damit, dass die proteolytische Aktivität ebenfalls nicht für die Sekretion dieses Zytokins notwendig ist. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass TNF- $\alpha$  nicht gemessen werden konnte. Gleichfalls konnte auch gezeigt werden, dass Sap1, Sap2 und Sap6 zu einem sehr starken TNF- $\alpha$ -Anstieg führen [76]. Da nicht bekannt ist, in welchem Umfang die Sap-Isoenzyme gehemmt werden, ist es auch möglich, dass genau diese Enzyme eine Strukturveränderung aufgrund der Hemmung durchmachen, und so nicht mehr die strukturellen Voraussetzungen zur Aktivierung der TNF- $\alpha$ -Sekretion besitzen. Wie schon bei GM-CSF könnten jedoch auch das verwendete Hautmodell und/ oder die Methodik ursächlich sein.

Bisher wurde die mRNA-Freisetzung in erster Linie im Skinethic® Hautmodell untersucht und nicht wie in dem hier verwendeten MatTek Hautkonstrukt [97, 98, 101, 104].

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe des MatTek-Hautkonstrukts lassen sich Interaktionen zwischen Wirt und Hefezellen charakterisieren, mit dem Ziel, durch Aufklärung molekularer Wirkungsmechanismen Therapiekonzepte zu entwickeln oder zu verbessern.

In der hier vorliegenden Arbeit diente das Hautkonstrukt der weiteren Charakterisierung potentieller innovativer Hemmstoffe vom Typ der sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap) für den möglichen Einsatz in weiterführenden Experimenten und schlussendlich für die Therapie der Candidose.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden neuen Sap-Inhibitoren M und R, wie auch Pepstatin A in der Lage sind die Adhärenz von *Candida albicans* an Keratinozyten, sowie Schaden am Epithel zu vermindern und die Zytokinfreisetzung als Bestandteil der Immunantwort des Wirtes zu verringern. Es ist somit gelungen die neuen Inhibitoren mit Hilfe der hier eingesetzten Experimente weiter zu charakterisieren.

In dem verwendeten Hautkonstrukt wurde gezeigt, dass *Candida albicans* Epithelschäden an oralen Hautkonstrukten verursacht und dieser Schaden durch die Zugabe von Sap-Inhibitoren verringert werden kann. Gleichzeitig führte die Schädigung des Gewebes zu einem bestimmten proinflammatorischen Zytokinmuster, dass durch die Zugabe von Sap-Inhibitoren wie Pepstatin A und seiner Analoga ebenfalls abgeschwächt werden konnte. Die verwendete CBA-Methode, die einen direkten Nachweis der fertigen Zytokine im Medium ermöglicht, führte zu ähnlichen Ergebnissen, wie die unter Verwendung der RT-PCR in der Literatur bereits beschrieben wurde.

Die beiden Inhibitoren M und R sind Pepstatin A in allen Versuchen überlegen, d. h. sie verringern die Anzahl adhärenter Candida-Zellen, den Schaden an Epithelien und die Zytokinfreisetzung stärker, als es für Pepstatin A nachweisbar ist, bzw. es sind für den gleichen Effekt geringere Inhibitor-Konzentrationen erforderlich.

Inhibitor M wurde dabei als potentester Wirkstoff der beiden getesteten Hemmstoffe identifiziert. Allerdings war das Potential aller Sap-Inhibitoren, Schaden am Hautkonstrukt zu verringern geringer als das des Fluconazols.

Weitere Untersuchungen werden erforderlich sein um zu prüfen, ob diese Ergebnisse aufgrund einer Dosiserhöhung im Hautkonstrukt-Versuch noch gesteigert werden können. Die im Adhärenz Assay höchste verwendete Konzentration, die gleichzeitig auch die höchste Abnahme an adhärenenten Candida-Zellen zeigte, konnte bisher im Hautmodell

nicht getestet werden. Dafür wird eine Überprüfung geeigneter Lösungsmittel oder Lösungsvermittler nötig sein. Ziel wird es sein Lösungsmittelleffekte in höheren Inhibitorkonzentrationen verlässlich ausschließen zu können und negative Einflüsse auf die Wirtszellen und auch die Hefezellen zu minimieren.

Weiterhin wird zu klären sein, ob die beobachtete Wirkung von Inhibitor M allein auf der Sap-Hemmung beruhen oder ob auch andere Prozesse beeinflusst werden, die die Schädigung des Epithels verhindern.

Da nur selten eine GM-CSF- bzw. TNF-Freisetzung beobachtet werden konnte, bleibt außerdem zu klären, welchem Umstand dies zu schulden ist. Zunächst könnte eine mRNA-Messung im Gewebe Auskunft darüber geben, ob die Genexpression von GM-CSF ansteigt während des Experimentes und damit das Hautmodell generell in der Lage wäre ausreichend Protein zu produzieren. Nach dem jetzigen Erkenntnisstand wurde dies ausschließlich für Hautmodelle der Firma Skinethic® durchgeführt. Mit ELISAs könnte überprüft werden ob diese Methode für den Nachweis von der beiden Zytokine ggf. besser geeignet wäre, als der eingesetzte CBA.

Inhibitor M sollte in jedem Fall als Wirkstoffkandidat für weitere Untersuchungen erwogen werden, da er eine dosisabhängige Wirkung bei relativ kleinen Mengen zeigte und in allen Experimenten das größte Potential bezüglich der Abnahme des Schadensausmaßes zeigt.

## 7 Verzeichnis eingesetzter Materialien

Reagenzien	Firma	Stadt, Land
<b>Zellkultur</b>		
Human Epidermale neonatale Keratinozyten	Cascade Biologics/Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Erhaltungsmedium (EpiLife® Medium)	Cascade Biologics/Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
EpiLife® Defined Growth Supplement (EDGS)	Cascade Biologics/Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
0,05% Trypsin-EDTA	Sigma	Seelze, Deutschland
Defined Trypsin Inhibitor	Cascade Biologics/Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Coating Matrix Kit	Cascade Biologics/Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Gentamicin (Gencin 40 mg)	Delta Select GmbH	Dreiech, Deutschland
Trypan Blau Lösung	Sigma	Seelze, Deutschland
<b>Hautkonstrukte</b>		
Hautkonstrukt (EpiOral®200)	MatTek	Ashland, Massachusetts/USA
steriles Erhaltungsmedium (ORL-200-ASY)	MatTek	Ashland, Massachusetts/USA
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	MatTek	Ashland, Massachusetts/USA
Formaldehydlösung 2,7% mit Phosphat	Apotheke des Innenstadtklinikums der LMU	München, Deutschland
Glutaraldehyd 25% in Wasser	Serva	Heidelberg, Deutschland
Osmiumtetroxid 4%	Serva	Heidelberg, Deutschland
Phosphatpuffer 0,2mol/l	Apotheke des Innenstadtklinikums der LMU	München, Deutschland
Glycidether	Serva	Heidelberg, Deutschland
Methylnadicanhydrid	Serva	Heidelberg, Deutschland
Dodecanylbernsteinsäureanhydrid	Serva	Heidelberg, Deutschland
p-Dimethylaminomethylphenol	Serva	Heidelberg, Deutschland
Gelantine	Merck	Darmstadt, Deutschland
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecanhydrid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Pyronin G- Lösung 1%	Apotheke des Innenstadtklinikums der LMU	München, Deutschland
Toludinblaulösung 1%/1%	Apotheke des Innenstadtklinikums der LMU	München, Deutschland



**Reagenzien**

Xylol  
Eukitt

**Firma**

Serva  
O. Kindler GmbH

**Stadt, Land**

Heidelberg, Deutschland  
Freiburg, Deutschland

**Cytometric Bead Array**

Human Soluble Protein Master Buffer Kit  
Human IL-1 $\alpha$  Flex Set  
Human IL-1 $\beta$  Flex Set  
Human IL-8 Flex Set  
Human GM-CSF Flex Set  
Human TNF Flex Set

BD Biosciences  
BD Biosciences  
BD Biosciences  
BD Biosciences  
BD Biosciences  
BD Biosciences

Heidelberg, Deutschland  
Heidelberg, Deutschland  
Heidelberg, Deutschland  
Heidelberg, Deutschland  
Heidelberg, Deutschland  
Heidelberg, Deutschland

**allgemein**

Phosphate buffered Saline (PBS)  
Pepstatin A  
Yeast Nitrogen Base (YNB)  
Aqua dest.  
Glucose-Monohydrat  
Ethanol (30, 50, 70, 90, 100%)

Cascade Biologics/Invitrogen  
Sigma  
Difco Laboratories GmbH  
BBraun  
Merck  
Apotheke des Innenstadtklinikums der LMU

Karlsruhe  
Seelze, Deutschland  
Augsburg, Deutschland  
Melsungen, Deutschland  
Darmstadt, Deutschland  
München, Deutschland

**Verbrauchsmaterialien**

1,0 mL Safe-Lock Tubes  
15 mL Röhrchen  
50 mL Röhrchen  
75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen  
96-well Zellkulturplatten (Flachboden)  
sterile Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)  
Pipettenspitzen (10 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L, 5000 $\mu$ L)  
sterile Kryo-Röhrchen  
sterile Einmalskalpelle (No. 11, No. 20)  
6-well Platten

Eppendorf AG  
Corning  
Corning  
Greiner Bio-one GmbH  
Nunc  
TPP  
Eppendorf AG  
Simport Ltd.  
Feather  
Becton Dickinson

Hamburg, Deutschland  
Tewksbury, Massachusetts/USA  
Tewksbury, Massachusetts/USA  
Frickhausen, Deutschland  
Langenselbold, Deutschland  
Trasadingen, Schweiz  
Hamburg, Deutschland  
Beloeil/Quebec, Kanada  
Osaka, Japan  
Franklin Lakes, New Jersey/ USA

**Reagenzien**

Pipettenspitzen (10µL, 200µL, 1000µL, 5000µL)  
sterile Kryo-Röhrchen  
sterile Einmalskalpelle (No. 11, No. 20)  
6-well Platten  
Sterilfilter 0,2 µm (steril Acrodisc 0,2µm)  
Rasierklinge  
Objektträger

**Firma**

Eppendorf AG  
Simport Ltd.  
Feather  
Becton Dickinson  
Gelman Sciences  
Wilkinson  
Hecht-Assistent

**Stadt, Land**

Hamburg, Deutschland  
Beloeil/Quebec, Kanada  
Osaka, Japan  
Franklin Lakes, New Jersey/ USA  
Ann Arbor, Michigan/ USA  
Solingen, Deutschland  
Sondheim/Röhn, Deutschland

**Geräte**

Sterilbank (Lamin Air®)  
Brutschrank (Heracell 240i)  
Schüttelinkubator (innova 4230)  
Feinwaage  
Wasserbad  
Kühlschrank-Tiefkühlschrank-Kombi  
Trimmer (Ultracut)  
Ultramikrotom  
Mikroskop  
Kamera (MR500)  
Heizplatte  
Zentrifuge

**Firma**

Heraeus  
ThermoFisher  
New Brunswick Scientific  
Kern & Sohn GmbH  
Memmert  
Liebherr  
Reichert Labtec  
Reichert Labtec  
Zeiss  
Zeiss  
Medax  
Sigma Zentrifugen GmbH

**Stadt, Land**

Osterode, Deutschland  
Langenselbold, Deutschland  
Hamburg, Deutschland  
Baldingen, Deutschland  
Schwabach, Deutschland  
Biberach a.d. Riss, Deutschland  
Wolfratshausen, Deutschland  
Wolfratshausen, Deutschland  
Jena, Deutschland  
Jena, Deutschland  
Kiel, Deutschland  
Osterode am Harz, Deutschland

## Puffer und Lösungen

YNB (*yeast nitrogene base*):

- 1,67 g YNB
- 2,5 g Glucose
- 25 mL *Aqua dest.*
- anschließend steril filtrieren

YPD (*yeast-extract-peptone-dextrose*):

- 50g YPD
- ad 1l *Aqua dest.*
- autoklavieren

Karnovsky Fixierung:

- 7,5 mL 2,7% Formaldehydlösung mit Phosphat
- 1 mL Glutaraldehyd 25%
- 1,5 mL *Aqua dest.*

Osmiumtetroxid Lösung:

- 2,5 mL Osmiumtetroxidlösung
- 7,5 mL Phosphatpuffer 0,2 mol/l

Kunstharzlösung (Verhältnis 3:2):

Komponente 1:

- 100 mL Glycidether
- 89 mL Methylnadicanhydrid

Komponente 2:

- 62 mL Glycidether
- 100 mL

Dodecanylbernsteinsäureanhydrid

Polymerisationsbeschleuniger:

- 1,5% p-Dimethylaminomethylphenol

Färbelösung:

- 10 mL Pyronin G-Lösung
- 40 mL Toludinblau-Boraxlösung 1%/1%

Beschichtungslösung für Objektträger:

- 300 mL *Aqua dest.*
- 2,1 g Gelatine
- 0,16 g Chrom(III)-kaliumsulfat-Dodecanhydrat (Chromalaun)
- Wasser auf 60°C erwärmen
- Gelatine auflösen
- Chromalaun hinzugeben
- filtrieren

## 8 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
°C	Grad Celsius
bzw.	beispielsweise, beziehungsweise
C.	<i>Candida</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDGS	Wachstumsfaktoren für Epilife-Medium ( <i>Epilife defined growth supplements</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
HIV	humanes Immundefizienz Virus
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MHK	minimale Hemmkonzentration
mol/l	mol pro Liter
NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered Saline</i> )
PMN	polymorphkernige Leukozyten ( <i>polymorphonuclear leukocytes</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
Sap	sekretierende Aspartat Proteinasen (Enzym)
SAP	sekretierende Aspartat Proteinasen (Gen)
U	Einheiten ( <i>units</i> )
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
YNP	<i>yeast nitrogene base</i>
YPD	<i>yeast-extracte-peptone-dextrose</i>

## 9 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Christian Korting für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, die Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung herzlich bedanken. Sein Interesse an meiner Arbeit und seine konstruktiven Beiträge, in allen Phasen meiner Promotion, trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Auch bei seiner Ehefrau, Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting möchte ich noch einmal herzlich für die Hilfe bedanken, da sie mir auch in schweren Zeiten immer beigestanden hat.

Frau PD Dr. Borelli danke ich für die vorangegangene Arbeit und Überlassung der synthetisierten Inhibitoren, durch die mein Projekt erst möglich wurde, sowie die Bereitschaft, meine Arbeit zu verfolgen und dabei Anregungen für neue Denkanstöße zu geben.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Burkhard Summer und Herrn PD Dr. Ronald Wolf für ihre engagierte, intensive und stets freundliche, geduldige Betreuung und ihre kompetente Unterstützung, sowie das Probelesen meiner Arbeit und die konstruktive Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch bei Frau Andrea Kieslinger und Frau Johanna Laude für die Unterstützung im Labor, beim Vorbereiten von Experimenten, der Anfertigung von mikroskopischen Präparaten und Aufnahmen, sowie die moralische Unterstützung auf allen Ebenen herzlich bedanken. Frau Monika Döbl half mir mit ihrer freundlichen, kompetenten Art bei verschiedenen organisatorischen Fragen der Promotion.

Prof. Dr. Martin Schaller, Martina Pritschett, Christine von der Helm, Christoph Schopf, Dr. Nadja Kos und Sabine Fraschka haben mich tatkräftig mit ihrer ständigen Diskussionsbereitschaft und dem regen Wissens- und Ideenaustausch unterstützt.

Mein größter Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern für den Rückhalt und die Unterstützung um mir all das zu ermöglichen, was ich mir vorgenommen habe. Ich bin so dankbar, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Und es hat sich gelohnt!

## 10 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 259. Auflage 2001
2. Arai T., Mikami Y., Yokoyama K. (1977) Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils *Sabouraudia* 15: 171-177
3. Bais R., Philcox M. (1994) IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase (L-lactate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27) *J Automat Chem* 16: 167-182
4. Baltch A. L., Smith R. P., Franke M. A. et al (2001) Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans* *Antimicrob Agents Chemother* 45: 96-104
5. Beausejour A., Grenier D., Goulet J. P. et al (1998) Proteolytic activation of the interleukin-1 $\beta$  precursor by *Candida albicans* *Infect Immun* 66: 676-681
6. Bein M., Schaller M., Korting H. C. (2002) The secreted aspartic proteinases as a new target in the therapy of candidiasis *Curr Drug Targets* 3: 351-357
7. Bickel M., Nothen S. M., Freiburghaus K. et al (1996) Chemokine expression in human oral keratinocyte cell lines and keratinized mucosa *J Dent Res* 75: 1827-1834
8. Bonowitz A., Schaller M., Laude J. et al (2001) Comparative therapeutic and toxic effects of different povidone iodine (PVP-I) formulations in a model of oral candidosis based on in vitro reconstituted epithelium *J Drug Target* 9: 75-83
9. Borelli C., Ruge E., Schaller M. et al (2007) The crystal structure of the secreted aspartic proteinase 3 from *Candida albicans* and its complex with pepstatin A *Proteins* 68: 738-748
10. Borelli C. 2008 Sezernierte Aspartatproteinasen (Sap) von *Candida albicans* - Synthese von Inhibitoren mit dem Ziel einer gezielten Arzneistoffentwicklung auf Basis von Röntgenkristallstrukturanalyse und Molecular Modelling Ludwig-Maximilians-Universität München, München
11. Borelli C., Ruge E., Lee J. H. et al (2008) X-ray structures of Sap1 and Sap5: structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans* *Proteins* 72: 1308-1319
12. Borg-von Zepelin M., Beggah S., Boggian K. et al (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages *Molecular Microbiology* 28: 543-554

13. Borg M., Ruchel R. (1988) Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa *Infect Immun* 56: 626-631
14. Cadicamo C. D., Asante V., Abu Ammar M. et al (2009) Investigation of the synthetic route to pepstatin analogues by SPPS using O-protected and O-unprotected statine as building blocks *J Pept Sci* 15: 272-277
15. Calderone R. A., Fonzi W. A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans* *Trends Microbiol* 9: 327-335
16. Calderone Richard 2002 *Candida and Candidiasis* Washington D.C.: American Society for Microbiology
17. Cassone A., De Bernardis F., Torosantucci A. et al (1999) In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors *J Infect Dis* 180: 448-453
18. Castro M., Bjoraker J. A., Rohrbach M. S. et al (1996) *Candida albicans* induces the release of inflammatory mediators from human peripheral blood monocytes *Inflammation* 20: 107-122
19. Cheng G., Yeater K. M., Hoyer L. L. (2006) Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response *Eukaryot Cell* 5: 180-191
20. Cotter G., Kavanagh K. (2000) Adherence mechanisms of *Candida albicans* *Br J Biomed Sci* 57: 241-249
21. Cutler J. E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans* *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218
22. Dalle F., Wachtler B., L'Ollivier C. et al (2010) Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes *Cell Microbiol* 12: 248-271
23. De Bernardis F., Sullivan P. A., Cassone A. (2001) Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity *Med Mycol* 39: 303-313
24. Dinarello C. A. (1997) Interleukin-1 Cytokine Growth Factor *Rev* 8: 253-265
25. Dongari-Bagtzoglou A., Kashleva H. (2003) *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells *Microb Pathog* 34: 169-177
26. Dongari-Bagtzoglou A., Kashleva H. (2003) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses of oral epithelial cells to *Candida albicans* *Oral Microbiol Immunol* 18: 165-170
27. Dongari-Bagtzoglou A., Kashleva H., Villar C. C. (2004) Bioactive interleukin-1 $\alpha$  is cytolytically released from *Candida albicans*-infected oral epithelial cells *Med Mycol* 42: 531-541

28. Dongari-Bagtzoglou A., Villar C. C., Kashleva H. (2005) *Candida albicans*-infected oral epithelial cells augment the anti-fungal activity of human neutrophils in vitro *Med Mycol* 43: 545-549
29. Douglas L. J. (1987) Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces *Crit Rev Microbiol* 15: 27-43
30. Douglas L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection *Trends Microbiol* 11: 30-36
31. Eversole L. R., Reichart P. A., Ficarra G. et al (1997) Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84: 372-380
32. Felk A., Kretschmar M., Albrecht A. et al (2002) *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs *Infect Immun* 70: 3689-3700
33. Fidel P. L., Jr. (2002) Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis *Med Mycol* 40: 359-375
34. Fu Y., Luo G., Spellberg B. J. et al (2008) Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans* *Eukaryot Cell* 7: 483-492
35. Gauwerky K., Borelli C., Korting H. C. (2009) Targeting virulence: a new paradigm for antifungals *Drug Discov Today* 14: 214-222
36. Gow N. A., Perera T. H., Sherwood-Higham J. et al (1994) Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans* *Scanning Microsc* 8: 705-710
37. Gruber A., Speth C., Lukasser-Vogl E. et al (1999) Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro *Immunopharmacology* 41: 227-234
38. Hacker J., Heesemann J. 2002 *Molekulare Infektionsbiologie: Spektrum Akademischer Verlag*
39. Haller I. (1985) Mode of action of clotrimazole: implications for therapy *Am J Obstet Gynecol* 152: 939-944
40. Hoegl L., Ollert M., Korting H. C. (1996) The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of Kandidoses *J Mol Med* 74: 135-142
41. Hoegl L., Thoma-Greber E., Rocken M. et al (1998) HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: a 2-year study *Mycoses* 41: 321-325



42. Homma M., Chibana H., Tanaka K. (1993) Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans* J Gen Microbiol 139 Pt 6: 1187-1193
43. Hostetter M. K. (1998) Linkage of adhesion, morphogenesis, and virulence in *Candida albicans* J Lab Clin Med 132: 258-263
44. Hube B., Sanglard D., Odds F. C. et al (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence Infect Immun 65: 3529-3538
45. Jones T. C. (1996) The effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on macrophage function in microbial disease Med Oncol 13: 141-147
46. Kennedy M. J., Rogers A. L., Hanselmen L. R. et al (1988) Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes Mycopathologia 102: 149-156
47. Kimura L. H., Pearsall N. N. (1978) Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells Infect Immun 21: 64-68
48. Kimura L. H., Pearsall N. N. (1980) Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells Infect Immun 28: 464-468
49. King R. D., Lee J. C., Morris A. L. (1980) Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells Infect Immun 27: 667-674
50. Klausner Mitchell, Ayehunie Seyoum, Breyfogle Bridget A. et al (2007) Organotypic human oral tissue models for toxicological studies Toxicology in Vitro 21: 938-949
51. Korting H. C. 1995 Dermatotherapie Heidelberg Berlin New York: Springer Verlag
52. Korting H. C., Patzak U., Schaller M. et al (1998) A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment J Infect 36: 259-267
53. Korting H. C., Schaller M., Eder G. et al (1999) Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients Antimicrob Agents Chemother 43: 2038-2042
54. Korting H. C., Hube B., Oberbauer S. et al (2003) Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium J Med Microbiol 52: 623-632
55. Kostura M. J., Tocci M. J., Limjuco G. et al (1989) Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity Proc Natl Acad Sci U S A 86: 5227-5231

56. Lambers H., Piessens S., Bloem A. et al (2006) Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora *Int J Cosmet Sci* 28: 359-370
57. Lermann U., Morschhauser J. (2008) Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans* *Microbiology* 154: 3281-3295
58. Lewis R. E. (2009) Overview of the changing epidemiology of candidemia *Curr Med Res Opin* 25: 1732-1740
59. Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A. (2007) *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen *J Dent Res* 86: 204-215
60. Macdonald F., Odds F. C. (1980) Purified *Candida albicans* proteinase in the serological diagnosis of systemic candidosis *JAMA* 243: 2409-2411
61. Macdonald F., Odds F. C. (1983) Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant *J Gen Microbiol* 129: 431-438
62. Masuoka J., Hazen K. C. (1997) Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity *Microbiology* 143 ( Pt 9): 3015-3021
63. McCarron P. A., Donnelly R. F., Canning P. E. et al (2004) Bioadhesive, non-drug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis *Biomaterials* 25: 2399-2407
64. Mizutani H., Black R., Kupper T. S. (1991) Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes *J Clin Invest* 87: 1066-1071
65. Mostefaoui Y., Bart C., Frenette M. et al (2004) *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and secretion by engineered human oral mucosa cells *Cell Microbiol* 6: 1085-1096
66. Munro C. A., Hube B. (2002) Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy *Trends Microbiol* 10: 173-177
67. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. et al 2005 Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
68. Naglik J., Albrecht A., Bader O. et al (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions *Cell Microbiol* 6: 915-926

69. Naglik J. R., Challacombe S. J., Hube B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis Microbiol Mol Biol Rev 67: 400-428, table of contents
70. Naglik J. R., Moyes D., Makwana J. et al (2008) Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis Microbiology 154: 3266-3280
71. Nikawa H., Nishimura H., Hamada T. et al (1997) Quantification of thigmotropism (contact sensing) of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Mycopathologia 138: 13-19
72. Nolting S., Fegeler K. 1993 Medizinische Mykologie Heidelberg Berlin New York: Springer Verlag
73. Odds F. C., Brown A. J., Gow N. A. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action Trends Microbiol 11: 272-279
74. Ollert M. W., Sohnchen R., Korting H. C. et al (1993) Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes Infect Immun 61: 4560-4568
75. Ollert M. W., Wende C., Gorlich M. et al (1995) Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients J Clin Microbiol 33: 2543-2549
76. Pietrella D., Rachini A., Pandey N. et al (2010) The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity Infect Immun 78: 4754-4762
77. Preusser HJ. 1982 *Trichophyton rubrum, Candida albicans*: Biologie, Cytologie, Wirkung von Imidazolderivaten Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
78. Rawlings A. V., Harding C. R. (2004) Moisturization and skin barrier function Dermatol Ther 17 Suppl 1: 43-48
79. Ray T. L., Digre K. B., Payne C. D. (1984) Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity J Invest Dermatol 83: 37-41
80. Richardson M. D. (2005) Changing patterns and trends in systemic fungal infections J Antimicrob Chemother 56 Suppl 1: i5-i11
81. Ruchel R., Ritter B., Schaffrinski M. (1990) Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin Zentralbl Bakteriol 273: 391-403
82. Ruchel R., Zimmermann F., Boning-Stutzer B. et al (1991) Candidiasis visualised by proteinase-directed immunofluorescence Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 419: 199-202

83. Ruge E., Korting H. C., Borelli C. (2005) Current state of three-dimensional characterisation of antifungal targets and its use for molecular modelling in drug design *Int J Antimicrob Agents* 26: 427-441
84. Ruge E. 2008 Röntgenkristallographische Charakterisierung der sezernierten Aspartatproteinasen von *Candida albicans* als Grundlage einer gezielten Arzneistoffentwicklung Ludwig-Maximilians-Universität München, München
85. Salfelder K., Ueda K., Quiroga E. L. et al (1977) Visceral candidosis. Anatomic study of 34 cases *Curr Top Pathol* 64: 177-224
86. Samaranayake L. P., Keung Leung W., Jin L. (2009) Oral mucosal fungal infections *Periodontol* 2000 49: 39-59
87. Sanglard D., Hube B., Monod M. et al (1997) A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence *Infect Immun* 65: 3539-3546
88. Sanglard D. (2002) Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs *Curr Opin Microbiol* 5: 379-385
89. Sanglard D., Odds F. C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences *Lancet Infect Dis* 2: 73-85
90. Schaller M., Korting H. C., Schafer W. et al (1998) [Investigations on the regulation of secreted aspartyl proteases in a model of oral candidiasis in vivo] *Mycoses* 41 Suppl 2: 69-73
91. Schaller M., Schafer W., Korting H. C. et al (1998) Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity *Molecular Microbiology* 29: 605-615
92. Schaller M., Hube B., Ollert M. W. et al (1999) In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients *J Invest Dermatol* 112: 383-386
93. Schaller M., Korting H. C., Schafer W. et al (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis *Molecular Microbiology* 34: 169-180
94. Schaller M., Preidel H., Januschke E. et al (1999) Light and electron microscopic findings in a model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis following the topical application of different econazole formulations *J Drug Target* 6: 361-372
95. Schaller M., Schackert C., Korting H. C. et al (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis *Journal of Investigative Dermatology* 114: 712-717

96. Schaller M., Januschke E., Schackert C. et al (2001) Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo *J Med Microbiol* 50: 743-747
97. Schaller M., Mailhammer R., Grassl G. et al (2002) Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence *J Invest Dermatol* 118: 652-657
98. Schaller M., Mailhammer R., Korting H. C. (2002) Cytokine expression induced by *Candida albicans* in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis *J Med Microbiol* 51: 672-676
99. Schaller M., Bein M., Korting H. C. et al (2003) The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium *Infect Immun* 71: 3227-3234
100. Schaller M., Krnjaic N., Niewerth M. et al (2003) Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans* *J Med Microbiol* 52: 247-249
101. Schaller M., Boeld U., Oberbauer S. et al (2004) Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis *Microbiology* 150: 2807-2813
102. Schaller M., Borelli C., Korting H. C. et al (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans* *Mycoses* 48: 365-377
103. Schaller M., Korting H. C., Borelli C. et al (2005) *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis *Infect Immun* 73: 2758-2765
104. Schaller M., Zakikhany K., Naglik J. R. et al (2006) Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia *Nat Protoc* 1: 2767-2773
105. Schaller M., Zakikhany K., Weindl G. et al (2008) [Characterization of the interaction between *Candida albicans* and host cells: In vitro model using reconstituted human skin and mucosa] *Hautarzt* 59: 964-970
106. Schofield D. A., Westwater C., Warner T. et al (2005) Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection *FEMS Microbiol Lett* 244: 359-365
107. Schumann G., Bonora R., Ceriotti F. et al (2002) IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase *Clin Chem Lab Med* 40: 643-648
108. Semlin L., Schafer-Korting M., Borelli C. et al (2011) In vitro models for human skin disease *Drug Discov Today* 16: 132-139

109. Sherwood J., Gow N. A., Gooday G. W. et al (1992) Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration J Med Vet Mycol 30: 461-469
110. Soll D. R. (1992) High-frequency switching in *Candida albicans* Clin Microbiol Rev 5: 183-203
111. Soll D. R. (1997) Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans* Microbiology 143 ( Pt 2): 279-288
112. Soll D. R. (2004) Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans* Bioessays 26: 10-20
113. Staib F. (1965) Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi Sabouraudia 4: 187-193
114. Steele C., Fidel P. L., Jr. (2002) Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans* Infect Immun 70: 577-583
115. Sterry W., Burgdorf W., Paus R. 2010 Checkliste Dermatologie Stuttgart: Thieme Verlag
116. Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H. et al (1970) Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes J Antibiot (Tokyo) 23: 259-262
117. Verduyn Lunel F. M., Meis J. F., Voss A. (1999) Nosocomial fungal infections: candidemia Diagn Microbiol Infect Dis 34: 213-220
118. Vonk A. G., Netea M. G., van der Meer J. W. et al (2006) Host defence against disseminated *Candida albicans* infection and implications for antifungal immunotherapy Expert Opin Biol Ther 6: 891-903
119. Watts H. J., Cheah F. S., Hube B. et al (1998) Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes FEMS Microbiol Lett 159: 129-135
120. White T. C., Agabian N. (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors J Bacteriol 177: 5215-5221
121. Whiteway M., Oberholzer U. (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions Curr Opin Microbiol 7: 350-357
122. Wildfeuer A., Seidl H. P. (1995) Comparison of the in vitro activity of fluconazole against *Candida albicans* and dermatophytes Arzneimittelforschung 45: 819-821
123. Wright B. A., Fenwick F. (1981) Candidiasis and atrophic tongue lesions Oral Surg Oral Med Oral Pathol 51: 55-61

124. Yu L., Lee K. K., Paranchych W. et al (1996) Use of synthetic peptides to confirm that the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilus adhesin and the *Candida albicans* fimbrial adhesin possess a homologous receptor-binding domain *Molecular Microbiology* 19: 1107-1116
125. Zingman B. S. (1996) Resolution of refractory AIDS-related mucosal candidiasis after initiation of didanosine plus saquinavir *N Engl J Med* 334: 1674-1675
126. <http://www.presseportal.de/polizeipresse/pm/65857/2053120/pol-vie-wenn-polizisten-vorfahrt-haben>, Stand: 19.09.2011
127. <http://neuropa.zbh.uni-hamburg.de/research/ESB/>, Stand: 19.09.2011